

Funktionelle Charakterisierung von Notch1-Zielgenen
während der neuroektodermalen und mesodermalen
Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Simone Martini

Kiel,

Juni 2011

Referent/in: Frau Prof. Dr. Ursula Just

Korreferent/in: Herr Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2011

Zum Druck genehmigt: Kiel, 19.07.2011

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung der Arbeit.....	7
1.1. Zusammenfassung.....	7
1.2. Summary.....	8
2. Einleitung.....	9
2.1. Frühe Embryogenese der Maus.....	9
2.1.1. Embryonale Stammzellen.....	12
2.2. Neurogenese.....	14
2.2.1. Die Entwicklung des Zentralnervensystems.....	14
2.2.1.1. Die Neurulation.....	14
2.2.1.2. Zelltypen des Zentralnervensystems.....	16
2.2.2. Die Entwicklung der Neuralleiste.....	19
2.3. Notch.....	20
2.3.1. Notch-Rezeptoren.....	20
2.3.2. Notch-Liganden.....	21
2.3.3. Der klassische Notch-Signalweg.....	22
2.3.4. Die Regulation des Notch-Signalweges.....	23
2.3.5. Funktionen von Notch.....	24
2.3.5.1. Funktionen von Notch in der embryonalen Neurogenese.....	25
2.4. Der Transkriptionsfaktor <i>Sox9</i>	27
2.5. Der Transkriptionsfaktor <i>Pax6</i>	29
2.6. Der Transkriptionsfaktor <i>Runx1</i>	31
2.7. Fragestellung der Arbeit und Strategie.....	32
2.7.1. Fragestellung.....	32
2.7.2. Das NERT-Konstrukt.....	33
2.7.3. Die siRNA-Strategie.....	34
3. Material und Methoden	36
3.1. Material	36
3.1.1. Murine embryonale Stammzellen	36
3.1.2. Reagenzien	36
3.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien	38
3.1.3.1. Geräte	38
3.1.3.2. Verbrauchsmaterialien	38
3.1.4. Kits	39

3.1.5. Assays für Real-Time PCR	39
3.1.6. Primer	40
3.1.7. Puffer, Lösungen und Zellkultur-Medien.....	40
3.1.8. Antikörper.....	42
3.1.8.1. Primäre Antikörper	42
3.1.8.2. Sekundäre Antikörper	43
3.1.8.3. Isotyp-Kontrolle	43
3.1.9. siRNA	43
3.1.10. Software	43
3.2. Methoden	44
3.2.1. Zellkulturmethoden	44
3.2.1.1. Kultur undifferenzierter embryonaler Stammzellen	44
3.2.1.2. Einfrieren und Auftauen von embryonalen Stammzellen	44
3.2.1.3. Neurale Differenzierung von embryonalen Stammzellen	44
3.2.1.4. Mesodermale Differenzierung von embryonalen Stammzellen	45
3.2.1.5. Mycoplasmen-PCR	46
3.2.1.6. Intrazelluläre FACS-Analyse	46
3.2.1.7. Extrazelluläre FACS-Analyse	47
3.2.1.8. siRNA Transfektion	47
3.2.2. RNA-Methoden	48
3.2.2.1. RNA-Isolierung	48
3.2.2.2. RNA-Konzentrationsbestimmung	48
3.2.2.3. Agarosegel	48
3.2.2.4. RNA-Fällung	48
3.2.3. cDNA-Synthese.....	48
3.2.4. <i>Real-Time</i> PCR.....	49
3.2.5. Protein-Methoden	50
3.2.5.1. Proteinisolierung	50
3.2.5.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	50
3.2.5.3. Trichloressigsäure-Fällung.....	50
3.2.5.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	51
3.2.5.5. Western Blot	51
3.2.5.6. „Strippen“ einer Nitrocellulosemembran.....	52
3.2.5.7. Immunfluoreszenzfärbung	52
3.2.6. Statistische Methoden	53

4. Ergebnisse	54
4.1. Einfluss von Notch1 auf die neurale Differenzierung	54
4.1.1. Einfluss von Notch1 auf die Zellmorphologie während der neuronalen Differenzierung	54
4.1.2. Induktion der Expression des Gliazellmarkerproteins GFAP und Verringerung des Neuronenvorläufermarkerproteins Tubb3 durch Aktivierung von Notch1.....	57
4.1.3. Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von ausgewählten Markergenen verschiedener Entwicklungsstufen in EB5-Nert Zellen während der <i>in vitro</i> Differenzierung	61
4.1.3.1. Stammzellmarker und Marker für sehr frühe Embryonalentwicklung.....	61
4.1.3.2. Endodermale und mesodermale Marker	70
4.1.3.3. Neuronale Marker und Marker für Gliavorläufer.....	72
4.1.3.4. Neuralleistenmarker.....	77
4.1.4. Keine Veränderung der mRNA-Expression ausgewählter Markergene verschiedener Entwicklungsstufen durch OHT in EB5-Kontrollzellen während der <i>in vitro</i> Differenzierung	84
4.1.5. Förderung der Entwicklung von Gliazellen und neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen mit gleichzeitiger Inhibition von Neuronenvorläufern durch Notch1-Aktivierung	89
4.2. Die Rolle von <i>Sox9</i> bei den durch Notch1 vermittelten Effekten während der neuronalen Differenzierung	93
4.2.1. Induktion der <i>Sox9</i> -mRNA-Expression durch Notch1-Aktivierung	93
4.2.2. Induktion von <i>Sox9</i> während der frühen neuronalen Differenzierung durch Notch1-Aktivierung in Abwesenheit von Proteinsynthese.....	96
4.2.3. Herunterregulierung von <i>Sox9</i> -mRNA als auch <i>Sox9</i> -Protein durch <i>Sox9</i> -siRNA.....	98
4.2.4. Vermittlung der Notch1-induzierten Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen durch <i>Sox9</i>	102
4.2.5. Kein offensichtlicher Einfluss auf die Notch1 induzierte Differenzierung in Neuralleistenzellen durch <i>Sox9</i>	106
4.3. Die Rolle von <i>Pax6</i> bei den durch Notch1 vermittelten Effekten während der neuronalen Differenzierung	112
4.3.1. Zunächst Induktion, später Repression der <i>Pax6</i> -mRNA-Expression durch Notch1 während der neuronalen Differenzierung	113
4.3.2. Induktion von <i>Pax6</i> während der frühen neuronalen Differenzierung durch Notch1-Aktivierung in Abwesenheit von Proteinsynthese	115

4.3.3. Herunterregulierung der <i>Pax6</i> -mRNA als auch des Pax6-Proteins durch <i>Pax6</i> -siRNA	117
4.3.4. Kein offensichtlicher Einfluss von <i>Pax6</i> auf die durch Notch1 induzierte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen	118
4.4. Die Rolle von <i>Runx1</i> bei der durch Notch1 vermittelten Reduktion der Flk-1- positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung	122
5. Diskussion	124
5.1. Einfluss von Notch1 auf die neurale Differenzierung	125
5.2. Einfluss von Sox9 auf die durch Notch1 vermittelte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen und die Differenzierung in Neuralleistenzellen	131
5.3. Einfluss von Pax6 auf die durch Notch1 vermittelte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen.....	140
5.4. Erste Untersuchungen zum Einfluss von Runx1 auf die durch Notch1 vermittelte Reduktion der Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung ..	143
6. Literaturverzeichnis.....	145
7. Publikationen.....	156
8. Abkürzungsverzeichnis.....	157
9. Lebenslauf	159
10. Danksagung.....	160
11. Eidesstattliche Erklärung.....	161

1. Zusammenfassung der Arbeit

1.1 Zusammenfassung

Der Notch-Signalweg nimmt äußerst vielfältige und essentielle Funktionen sowohl im embryonalen als auch im adulten Organismus wahr. Obwohl die grundsätzliche Funktionsweise der Notch-Signaltransduktion aufgeklärt wurde, ist insbesondere über den Mechanismus und die Regulation der zellkontextabhängigen Wirkungen noch wenig bekannt. Beispielsweise ist ungeklärt, wie durch Notch die Zelllinienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen, die Induktion der Neuralleistendifferenzierung sowie die Blockierung der mesodermalen Differenzierung molekular vermittelt wird. Ausgangspunkt dieser Arbeit waren die von uns identifizierten Notch1-Zielgene Sox9, Pax6 und Runx1, die hier während der neuroektodermalen und mesodermalen Entwicklung im Zusammenhang mit der Notch1-Aktivierung untersucht wurden. Dazu wurden embryonale Stammzellen mit einem induzierbaren Notch1-Konstrukt verwandt. Um den Einfluss dieser Notch1-Zielgene näher betrachten zu können, wurde Notch1 aktiviert und gleichzeitig jeweils ein einzelnes der drei untersuchten Zielgene mittels siRNA herunterreguliert.

Es konnte gezeigt werden, dass Notch1 sowohl die Bildung von neuroektodermalen Zellen beschleunigt als auch die Entwicklung von Gliazellen gegenüber der von Neuronen stark begünstigt. Gleichzeitig induziert es direkt die Expression von Sox9 während der neuralen Differenzierung. Durch Herunterregulierung dieser Induktion bei gleichzeitiger Notch1-Aktivierung konnte nachgewiesen werden, dass Notch1 die Förderung der Gliogenese über sein Zielgen Sox9 erreicht. Dabei findet die Determinierung der späteren Gliazellen durch Notch1 bereits zu Beginn der neuralen Differenzierung statt und wird maßgeblich durch Sox9 reguliert. Auch an der durch Notch1 induzierten Beschleunigung der Entwicklung von neuroektodermalen Zellen am Anfang der Differenzierung konnte eine Beteiligung von Sox9 festgestellt werden, während ein Einfluss dieses Faktors auf den Notch1-Effekt der Induktion der Neuralleiste nicht nachgewiesen werden konnte. Für das zweite untersuchte direkte Notch1-Zielgen Pax6 konnte ebenfalls eine direkte Induktion durch Notch1 in den ersten beiden Tagen der Differenzierung nachgewiesen werden. Eine Herunterregulierung der Induktion dieses Faktors alleine reichte nicht aus, um die durch Notch1 hervorgerufenen Effekte zu revertieren. In ersten Untersuchungen konnte eine Induktion des dritten Zielgens Runx1 durch die Aktivierung von Notch1 und gleichzeitig eine Reduktion der Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung erreicht werden, was einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Analysen des Zusammenhangs zwischen Notch1, Runx1 und ihrer Rolle während der mesodermalen Differenzierung darstellt. Insgesamt wurde ein entscheidender Teil des Mechanismus, durch den Notch die Gliogenese induziert, identifiziert und zusätzlich eine Grundlage für die Charakterisierung weiterer Notch1-Zielgene gelegt.

1.2 Summary

The Notch signaling pathway mediates a variety of essential functions in the embryonic and adult organism. Although the basic molecular mechanism of the Notch signaling pathway has been elucidated, little is known about the mechanisms and regulation of the cell-context dependent Notch effects. In particular, the molecular basis of the Notch-mediated cell lineage decision between glial and neuronal cells, and the induction of neural crest differentiation during neurogenesis as well as the inhibition of mesodermal differentiation has been thus far not identified. The present study was based on our previous identification of the Notch1 target genes Sox9, Pax6 and Runx1 that were analyzed here during neuroectodermal and mesodermal development upon Notch1 activation. For this purpose embryonic stem cells carrying an inducible Notch1 construct were employed. To examine the role of these Notch1 target genes, Notch1 was activated while simultaneously the expression of each of the individual target genes was knocked down by siRNA, respectively.

This study revealed, that activation of Notch1 accelerated the early neuroectodermal differentiation and promoted strongly the formation of glial cells, while inhibiting the generation of neurons. Furthermore, Notch1 directly induced the expression of Sox9 during neural differentiation. By knocking down Sox9 induction during the concomitant Notch1 activation, the Notch1 induced promotion of gliogenesis was shown to be mediated substantially by Sox9. Notch1 induced determination of glial cells occurred very early during neural differentiation and was significantly regulated by Sox9 as well. Further results indicated that Sox9 was involved in the Notch1 induced acceleration of early neuroectodermal differentiation, while no impact of Sox9 on the Notch1 mediated induction of neural crest cell differentiation could be shown. Expression of Pax6, the second target gene examined, was also demonstrated to be directly induced by Notch1 activation during the first two days of neuroectodermal differentiation. However, the knockdown of Notch1 mediated induction of Pax6 alone did not result in a reversion of Notch1 induced effects. Preliminary analyses of the third target gene, Runx1, revealed a direct induction of this factor by Notch1 activation and at the same time a reduction of Flk-1 positive cells during mesodermal differentiation. This offers a promising starting point for further analyses of the relationship between Notch1, Runx1 and their role during mesodermal development. In conclusion, this study revealed an important aspect of the mechanisms that enable Notch to promote gliogenesis and in addition provides a basis for the further characterization of the roles of other Notch1 target genes.

2. Einleitung

2.1. Frühe Embryogenese der Maus

Um aus einer einzelnen Eizelle einen kompletten funktionsfähigen Organismus entstehen zu lassen, muss diese Zelle einen langen Weg durch verschiedene Entwicklungsstadien gehen (Surani *et al.*, 2007). Nach der Befruchtung beginnt die Zygote sich zu teilen. Bis zum 8-Zell-Stadium sind alle Zellen des sich nun entwickelnden Embryos totipotent, also dazu in der Lage in jeden einzelnen Zelltyp der künftigen Maus zu differenzieren. Beim Übergang vom 8- zum 16-Zell-Stadium bildet sich die sogenannte Morula. Es lassen sich erstmals zwei verschiedene Bereiche unterscheiden: das extraembryonale Trophektoderm (äußere Zellen), aus dem sich der fetale Teil der Plazenta entwickelt und die „Innere Zellmasse“ (IZM), aus der der Embryo entstehen wird. Diese beiden Regionen lassen sich zum Beispiel durch die Expression von *Oct4* (in der IZM) beziehungsweise *Cdx2* (im Trophektoderm) unterscheiden. Dies ist das erste Differenzierungsereignis der murinen Embryogenese. Die Morula entwickelt sich weiter zur Blastozyste: die Zellen des Trophektooderms sekretieren Flüssigkeit in das Innere der Morula und erzeugen so einen Hohlraum, das Blastocoel. Die innere Zellmasse befindet sich an einer Ecke des Blastocoels. Sie teilt sich anschließend in zwei unterschiedliche Gewebetypen: das primitive Endoderm mit Expression von *Gata6*, das den Dottersack bildet und nicht direkt zur Bildung des Embryos beiträgt und das primitive Ektoderm mit Expression von *Nanog*, aus dem der Epiblast und anschließend der Embryo entsteht und aus dem pluripotente embryonale Stammzellen gewonnen werden können (siehe 2.1.1). Der Epiblast durchläuft die Gastrulation, in der sich die drei Keimblätter, Ektoderm, Endoderm und Mesoderm, bilden und die für sie typischen Positionen einnehmen. Die ektodermalen Zellen befinden sich außen, die endodermalen innerhalb des Embryos und das Mesoderm dazwischen. Im Folgenden werden die verschiedenen Gewebetypen, die sich aus den drei Keimblättern entwickeln, kurz erläutert.

Das Keimblatt des **Endoderms** wird in zwei Gruppen unterteilt: das definitive und das viszerale Endoderm. Das viszerale Endoderm bildet extraembryonale Strukturen wie zum Beispiel den Dottersack. Die Zellen des definitiven Endoderms wandern während der Gastrulation in den Embryo ein und bilden den Urdarm (Archenteron). Aus diesem entwickeln sich unter anderem Magen, Gallenblase, Darm, Lungen, Schilddrüse, Leber, Thymus und Pankreas (Zorn und Wells, 2009). Im Zuge der Entwicklung der verschiedenen Organe muss die Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen und die Morphogenese der Gewebe reguliert werden. Dabei spielen zum Beispiel der Notch-, der Wnt- und der Nodal-Signalweg eine Rolle. Notch nimmt unter anderem Einfluss auf die Entwicklung des Pankreas. Hierbei verhindert es die vorzeitige Differenzierung der Pankreasvorläuferzellen in endokrine Zellen (Fujikura *et al.*, 2006). Auch bei der Entwicklung des Darmtraktes spielt Notch eine entscheidende Rolle: die Mutation des Notch-

Zielgens *Hes1* führt zu einer verstärkten Bildung von enterokrinen Zellen auf Kosten der Differenzierung in Enterozyten (Bolos *et al.*, 2007). Zusätzlich ergibt sich durch die Deletion von RBP-J oder den Einsatz eines γ -Sekretase-Inhibitors eine verringerte Proliferation endotheler Zellen des Darms (Bolos *et al.*, 2007). An der Spezifizierung des Endoderms während der Gastrulation ist Nodal (TGF- β (Transforming growth factor)-Familie) entscheidend beteiligt. Es ist notwendig und hinreichend, um die Entwicklung von Mesoderm und Endoderm zu initiieren. Dabei scheinen hohe Konzentrationen von Nodal die Differenzierung von Endoderm zu begünstigen, während geringe Konzentration zur Bildung von Mesoderm führen (Shen, 2007). Als Zielgen von Nodal ist neben *Mix*, *Foxa* und *Eomesodermin* (*Eomes*) das HMG (High-mobility group)-Protein *Sox17* ein wichtiger an der Endodermentwicklung beteiligter Transkriptionsfaktor (Kanai-Azuma *et al.*, 2002). Er ist unter anderem an der Segregation von Gallenblase und Pankreas beteiligt. Konstitutive *Sox17*-Expression führt zur Inhibition von Pankreaszelldifferenzierung und vermehrter Bildung von Gallenblasenzellen (Spence *et al.*, 2009).

Das **Mesoderm** wird in drei verschiedene Untergruppen eingeteilt: das paraxiale Mesoderm, das Seitenplattenmesoderm und das intermediäre Mesoderm. Aus diesen Gruppen entstehen jeweils unterschiedliche Gewebetypen. Zellen des paraxialen Mesoderms bilden die Somiten, die sich zu Knorpelzellen (Kato und Aoyama, 1998), Skelettmuskeln (Christ und Ordahl, 1995) und der Dermis des Rückens (Olivera-Martinez *et al.*, 2004) entwickeln. Der Transkriptionsfaktor *Sox9* ist, unter anderem zusammen mit *Runx2*, an der Differenzierung des paraxialen Mesoderms in Knorpelzellen (Chondrozyten) maßgeblich beteiligt (Goldring *et al.*, 2006). Aus dem Seitenplattenmesoderm entstehen Herzmuskelzellen (Stalsberg und DeHaan, 1969), murale Zellen, Blutzellen und Endothelzellen (Shalaby *et al.*, 1997) während aus dem intermediären Mesoderm das Urogenitalsystem hervorgeht.

Sowohl der Notch- als auch der Wnt- und der TGF- β -Signalweg sind an der Bildung des Mesoderms beteiligt. BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) beispielsweise ist genauso wie Wnt3 für die Bildung des Mesoderms während der Gastrulation unentbehrlich (Winnier *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1999). Nodal spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Primitivstreifens (Conlon *et al.*, 1994). Der Einfluss von Notch auf die mesodermale Differenzierung ist sehr vielfältig. Gut untersucht ist seine Rolle beispielsweise während der Segmentierung des präsomitischen Mesoderms. Hierbei werden verschiedene Gene oszillierend exprimiert, was zur Abschnürung der Somiten vom paraxialen Mesoderm führt. Dieser Mechanismus wird unter anderem durch den Notch-Signalweg reguliert (Cinquin, 2007). Ebenfalls gut untersucht ist der Einfluss von Notch auf die frühe mesodermale Differenzierung. Die fötale Leberkinase Flk-1 wird in frühen Zellen des Seitenplattenmesoderms exprimiert. Seine Expression ist für die Differenzierung von

Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen wichtig (Shalaby *et al.*, 1995; Nishikawa *et al.*, 1998). Bei der Zelllinienentscheidung zwischen diesen beiden Geweben spielt der Transkriptionsfaktor *Runx1* eine entscheidende Rolle. Hierbei ist er an der Herunterregulierung der *Flk-1*-Expression beteiligt (Lacaud *et al.*, 2002; Hirai *et al.*, 2005). Es ist ebenfalls bekannt, dass der Notch-Signalweg die Bildung von Flk-1-positiven Zellen inhibiert (Schroeder *et al.*, 2006) und die Aktivierung von Notch die Expression von *Runx1* induziert (Burns *et al.*, 2005). Notch spielt aber auch eine Rolle bei der Differenzierung von Herzzellen, muralen Zellen und Skelettmuskelzellen (Schroeder *et al.*, 2006; Bolos *et al.*, 2007).

Aus dem Keimblatt des **Ektoderms** gehen drei verschiedene Strukturen hervor: Epidermis, Neuralrohr und Neuralleiste. Zu den epidermalen Zelltypen gehören unter anderem Haut, Haare, Nägel und die Linse. Das Neuralrohr bildet sich im Zuge der Neurulation aus dem dorsalen Teil des Ektoderms (siehe 2.2.1). Aus ihm entsteht das zentrale Nervensystem mit Gehirn, Retina, Motoneuronen und Rückenmark. Hierzu gehören sowohl verschiedene Typen von Neuronen (unter anderem glutamaterge, GABAerge und dopaminerge Neurone) als auch Gliazellen. Die beiden bekanntesten Arten von Gliazellen sind Astrozyten und Oligodendrozyten. Die zellulären Fortsätze von Oligodendrozyten bilden Markscheiden aus Myelin, die die Axone der Neuronen umschließen und bieten ihnen Schutz und Unterstützung bei der Reizweiterleitung und Stoff- und Flüssigkeitsaufnahme. Astrozyten sind Gliazellen mit mehreren Fortsätzen, die sich an den Grenzen der Hirnhaut „Pia mater“ und der Blutgefäße eng zusammenlagern und so an der Funktion der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. Sie sind für die Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts im Gehirn erforderlich, bieten Unterstützung bei der Informationsweiterleitung und Nahrungsaufnahme der Neuronen und bilden nach Verletzungen von Axonen „Narben“, die unter anderem bei Querschnittslähmungen ein Wachsen der betroffenen Axone verhindern.

An der Spezifizierung ektodermaler Zellen beteiligte Signalwege sind unter anderem der Notch-, der Wnt-, der FGF (Fibroblast growth factor)- und TGF- β -Signalweg (Suter und Krause, 2008). Der FGF-Signalweg ist einer der ersten Signalwege, die während der neuralen Spezifizierung angeschaltet werden. Inhibiert man ihn in embryonalen Stammzellen, sind sie nicht mehr dazu in der Lage ektodermal zu differenzieren (Ying *et al.*, 2003). BMP hingegen blockiert die Induktion von Ektoderm und muss daher mit Hilfe von umliegenden Geweben ausgeschaltet werden, um ektodermale Entwicklung zu ermöglichen (Stern, 2006). Der Wnt- und der FGF-Signalweg aktivieren zusammen die Expression des Transkriptionsfaktors *Sox2*, der entscheidend zur neuralen Spezifizierung beiträgt (Takemoto *et al.*, 2006). Die Aktivierung des Notch-Signalweges in embryonalen Stammzellen führt zur schnelleren und ausschließlichen Determinierung in neurale Zellen, während durch Ausschalten von Notch die Bildung von neuralen Zelltypen unterdrückt wird (Lowell *et al.*, 2006). Während der neuralen Differenzierung fördert Notch die Erhaltung des Stammzell- oder Vorläufercharakters von neuralen Stammzellen oder

Vorläuferzellen (siehe 2.3.5.1). Damit inhibiert es die weitere Entwicklung dieser Zellen in Neuronen oder Gliazellen. Außerdem ist bekannt, dass Notch eine Rolle bei der Zelllinienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen spielt, wobei es die Differenzierung in Gliazellen begünstigt (siehe 2.3.5.1). Notch ist zudem an der Zelllinienentscheidung zwischen verschiedenen Neuronentypen, zum Beispiel zwischen GABAergen und primären Motoneuronen beteiligt (Cau und Blader, 2009). Die Funktionen von Notch während der Neurogenese werden unter 2.3.5.1 näher erläutert. Der Einfluss der beiden Transkriptionsfaktoren *Sox9* und *Pax6*, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden, wird unter 2.4 und 2.5 betrachtet.

Die **Neuralleiste** wird häufig als das vierte Keimblatt bezeichnet. Neuralleistenzellen entwickeln sich aus den Zellen am Rand der Neuralplatte zwischen den epidermalen Zellen und den Zellen, die das Neuralrohr formen (siehe 2.2.2). Diese durchlaufen den Prozess der EMT (Epithelial-mesenchymale Transition), bei dem sich Zellen aus ihrem epithelialen Verband lösen und zu migrieren beginnen. Diese migrierenden Neuralleistenzellen differenzieren unter anderem zu Neuronen und Gliazellen (zum Beispiel Schwann-Zellen) des sensorischen, sympathischen und parasympathischen Nervensystems, Melanozyten, den epinephrin-produzierenden Zellen des Nebennierenmarks und mesenchymalen Zelltypen wie Knorpel und Knochen des Kopfes (Steventon *et al.*, 2005). An der Induktion der Neuralleistenzellen sind der FGF- und der Wnt-Signalweg sowie Retinolsäure und BMPs maßgeblich beteiligt (Steventon *et al.*, 2005). Der Notch-Signalweg spielt ebenfalls eine Rolle bei der Spezifizierung der Neuralleiste und auch bei der weiteren Differenzierung von Neuralleistenzellen, indem seine Aktivierung zum Beispiel die Entwicklung von Neuronen inhibiert (Steventon *et al.*, 2005). Die Funktionen von Notch während der Entwicklung der Neuralleiste werden unter 2.3.5.1 näher erläutert. Der Transkriptionsfaktor *Sox9* spielt sowohl bei der Spezifizierung der Neuralleiste als auch bei der weiteren Differenzierung ihrer Derivate eine entscheidende Rolle (siehe 2.4).

2.1.1. Embryonale Stammzellen

Wie bereits erwähnt, werden pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aus der „Inneren Zellmasse“ (IZM) der Blastozyste gewonnen. Die IZM-Zellen lassen sich von den trophektodermalen Zellen durch die Expression von *Oct4* unterscheiden. Sie sind pluripotent, was bedeutet, dass sie in der Lage dazu sind, sich sowohl in Keimzellen als auch in alle somatischen Zellen des Organismus zu entwickeln. ES-Zellen besitzen diese Fähigkeit ebenso. Aus ihnen kann *in vitro* durch das Anpassen der Kulturbedingungen eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen erzeugt werden. Außerdem sind ES-Zellen dazu in der Lage, nach Injektion in eine Blastozyste zur Bildung chimärer Mäuse beizutragen, also Zellen aller drei Keimblätter und Keimzellen zu bilden. Zusätzlich ist es durch Expression von *Cdx2* beziehungsweise *Gata6* auch möglich, ES-

Zellen in trophektodermale beziehungsweise primitive Endoderm-Zellen zu differenzieren (Fujikura *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2005). Während die „Innere Zellmasse“ im Embryo eine transiente Struktur darstellt, können aus ihr isolierte ES-Zellen über Jahre hinweg in ihrem pluripotenten, selbsterneuernden Zustand erhalten werden, indem ihre Differenzierung inhibiert und ihre Proliferation angeregt wird (Niwa, 2007). Die Differenzierung von ES-Zellen wird häufig durch die Zugabe von LIF (Leukemia inhibitory factor) blockiert. LIF gehört zur Interleukin-6 Zytokin Familie und bindet an einen heterodimeren Rezeptor aus dem LIF-Rezeptor und gp130. Dadurch wird der Jak/Stat-Signalweg aktiviert, was durch die Phosphorylierung von *Stat3* und anschließende Aktivierung seiner Zielgene zur Erhaltung von ES-Zellen in ihrem pluripotenten Zustand führt (Niwa *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 1999). Auch aktivierende und inhibierende Chromatinmodifikationen und epigenetische Modifikationen der DNA der ES-Zellen tragen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz bei (Boheler, 2009). *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Klf4* und *c-Myc* sind typische Transkriptionsfaktoren, die in pluripotenten ES-Zellen exprimiert werden und an ihrer Selbsterneuerung beteiligt sind. Die Expression von vier dieser Faktoren (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* und *c-Myc*) reicht aus, um differenzierte, somatische Zellen wie zum Beispiel murine Fibroblasten zu ES-Zell-ähnlichen Zellen zu reprogrammieren (Stadtfield und Hochedlinger, 2010). Diese induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) wurden mittlerweile aus verschiedenen somatischen Zellen (zum Beispiel Keratinozyten (Aasen *et al.*, 2008), neuronalen Zellen (Eminli *et al.*, 2008) und Melanozyten (Utikal *et al.*, 2009)) aus verschiedenen Spezies, unter anderem aus der Maus (Takahashi und Yamanaka, 2006) und aus dem Menschen (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007) gewonnen. Ebenso wurden die vier Faktoren durch andere ergänzt beziehungsweise ausgetauscht. Zum Beispiel ist es gelungen, durch den Einsatz von *c-Myc/Klf4* und *Oct4* alleine neurale Stammzellen zu iPS-Zellen zu reprogrammieren, wobei der Grund hierfür zum Teil in der bereits vorhandenen hohen Expression von *Sox2* in diesen Zellen liegt (Eminli *et al.*, 2008). iPS-Zellen weisen erhebliche Ähnlichkeiten zu embryonalen Stammzellen auf: morphologisch können sie nicht voneinander unterschieden werden, sie erzeugen Teratome und sie tragen nach Injektion in eine Blastozyste zur Bildung von chimären Mäusen bei (Takahashi und Yamanaka, 2006). Auch genomweite Expressionsanalysen und Untersuchungen von Histonmodifikationen zeigen hohe Übereinstimmungen zwischen ES-Zellen und iPS-Zellen (Maherali *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2008; Okita *et al.*, 2008). Genauso wurden aber auch Unterschiede, zum Beispiel bei der Differenzierung in neuronale und hämatopoetische Zellen (Miura *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010), bei der DNA-Methylierung (Deng *et al.*, 2009; Doi *et al.*, 2009; Pick *et al.*, 2009) und der Expression von miRNAs (Wilson *et al.*, 2009) gefunden.

iPS-Zellen haben möglicherweise therapeutisches Potenzial (Stadtfield und Hochedlinger, 2010). So ist die Hoffnung groß, dass Abstoßungsreaktionen durch Transplantationen wegfallen oder genetische Defekte, zum Beispiel bei Sichelzellanämie, behoben werden könnten. Dazu könnten

iPS-Zellen aus somatischen Zellen des Patienten hergestellt und die genetischen Mutationen *in vitro* „repariert“ werden. Anschließend könnten die iPS-Zellen zu Vorläuferzellen von Erythrozyten differenziert und in den Patienten transplantiert werden, wo sie gesunde Erythrozyten produzieren. In Mäusen ist dies bereits gelungen (Hanna *et al.*, 2007). Eine andere Möglichkeit besteht darin, somatische Zellen nicht komplett in pluripotente iPS-Zellen zu dedifferenzieren, sondern sie lediglich teilweise zu reprogrammieren. Mit dieser Vorgehensweise können Ethikprobleme, die bei der Arbeit mit humanen embryonalen Stammzellen, aber auch mit iPS-Zellen auftreten, minimiert werden, da teilweise reprogrammierte Zellen nicht dazu in der Lage sind, einen vollständigen Organismus hervorzubringen. Außerdem besitzen diese Zellen ein geringeres teratogenes Potenzial. Insgesamt konnten solche Therapien allerdings noch nicht auf den Menschen übertragen werden. Ein Problem stellt das Potenzial der iPS-Zellen Teratome hervorzurufen dar. Andere Probleme sind, dass iPS-Zellen noch nicht ausreichend charakterisiert sind, häufig mit Hilfe von Retroviren hergestellt wurden und dass noch nicht geklärt ist, inwieweit sie noch ein epigenetisches Gedächtnis besitzen (Stadtfeld und Hochedlinger, 2010).

2.2. Neurogenese

2.2.1. Die Entwicklung des Zentralnervensystems

2.2.1.1. Die Neurulation

Sowohl das zentrale als auch das periphere Nervensystem gehen während der Embryonalentwicklung aus dem Keimblatt des Ektoderms hervor. Die Bildung des Nervensystems beginnt mit der Entstehung der Neuralplatte während der Gastrulation. Diese stellt eine Verdickung eines Teils des Ektoderms auf der dorsalen Oberfläche des Embryos dar. Die Induktion der Neuralplatte erfolgt unter anderem durch das darunterliegende dorsale Mesoderm (Smith und Schoenwolf, 1989). Durch Signale wie BMP4 und Wnt wird die Differenzierung von ektodermalen Zellen in epidermale Zellen gefördert und in neurale Zellen inhibiert (Christian und Moon, 1993; Wilson und Hemmati-Brivanlou, 1995). Die BMP4-Signale werden durch Sekretion von Antagonisten-Proteinen wie Noggin, Chordin und Follistatin durch das unter der Neuralplatte liegende Gewebe blockiert, was die Zellen der Neuralplatte daran hindert, zu Epidermiszellen zu differenzieren (Piccolo *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1996; Iemura *et al.*, 1998). Transkriptionsfaktoren wie Neurogenin und NeuroD (Lee *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996) sind daran beteiligt, die Zellen der Neuralplatte zu neuroektodermalen Zellen zu spezifizieren. Nach der Induktion der Neuralplatte bilden sich während der primären Neurulation am Rand der Neuralplatte die Neuralfalten, die die Neuralrinne begrenzen. Die Neuralfalten nähern sich einander an und fusionieren anschließend, wodurch das Neuralrohr entsteht (siehe Abb. 1.1). Aus ihm gehen die Zellen des Zentralnervensystems, also das Rückenmark und das Gehirn hervor. Die

Zellen des Oberflächenektoderms fusionieren ebenfalls und bilden eine epitheliale Schicht, aus der sich die Epidermis entwickelt. Dabei spielt die Expression von N- und E-Cadherin-Adhäsionsproteinen eine große Rolle. N-Cadherine werden in der Neuralplatte exprimiert, während E-Cadherine sich in der zukünftigen Epidermis befinden. Auf diese Art und Weise trennen sich die beiden epithelialen Schichten und fusionieren jeweils mit ihrem passenden Gegenstück (Hatta und Takeichi, 1986; Pla *et al.*, 2001). Im Rahmen der sekundären Neurulation, die sich im caudalen Bereich des zukünftigen Rückenmarks abspielt, kondensiert mesenchymales Gewebe mit mesodermalem Ursprung innerhalb des Embryos und bildet einen Hohlraum, welcher anschließend mit dem anterioren Neuralrohr verschmilzt und so ein durchgehendes Neuralrohr bildet, welches im Anschluss komplett mit einem Neuralepithel ausgekleidet wird (Greene und Copp, 2009). Am Vorgang der Neurulation sind verschiedene Signalwege und Faktoren wie zum Beispiel Retinolsäure und FGF-Signale beteiligt (Diez del Corral und Storey, 2004).

Auf die Regionalisierung des Gehirns und des Rückenmarks wie zum Beispiel die cranio-caudale oder die dorso-ventrale Polarisierung des Neuralrohrs soll hier nicht näher eingegangen werden.

Die Zellen am Rand der Neuralplatte an der Grenze zur Epidermis lösen sich im Rahmen der Neurulation von ihren Nachbarzellen und migrieren als Neuralleistenzellen an unterschiedliche Zielpunkte im gesamten Embryo, wo sie verschiedenste Zelltypen wie Neuronen und Gliazellen des peripheren Nervensystems und Chondrozyten bilden (siehe 2.2.2).

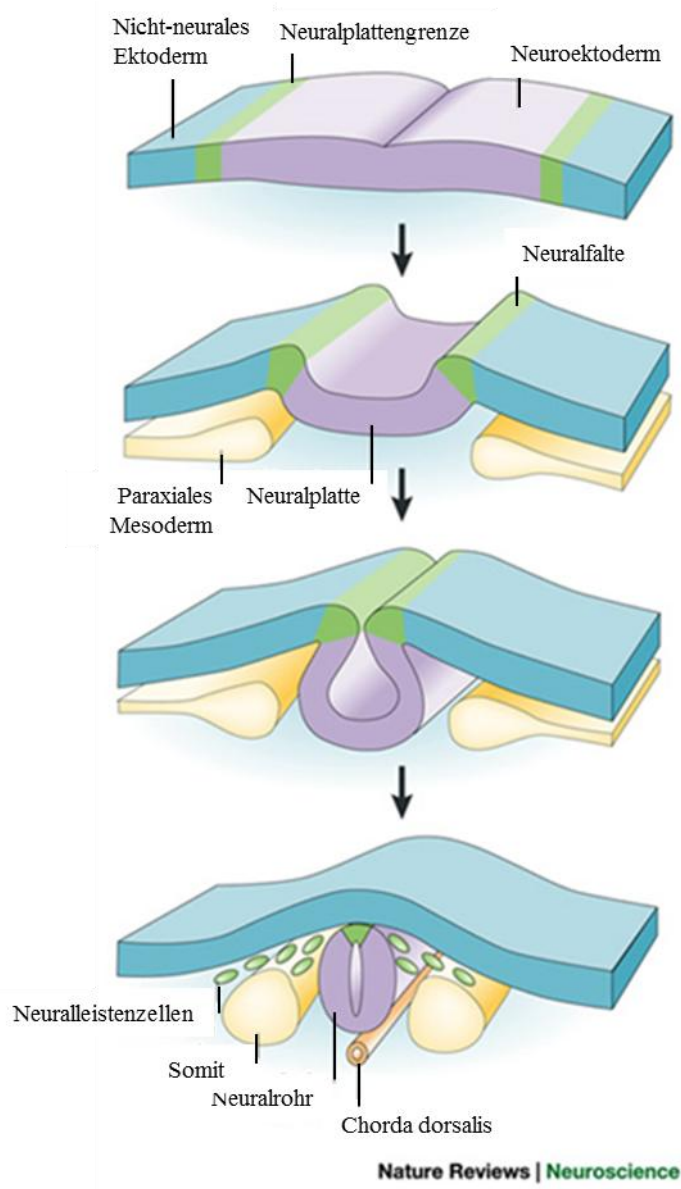


Abbildung 1.1 Modell der Neurulation

Die Neurulation beginnt mit der Induktion der Neuralplatte (lila). An den Rändern dieser bilden sich die Neuralfalten (grün), die sich über das restliche Ektoderm (blau) erheben, sich aneinander annähern und schließlich miteinander fusionieren, wobei sie das Neuralrohr (wieder lila) oberhalb der Chorda dorsalis (orange) bilden. Die Zellen an der Spitze der Neuralfalten befinden sich nach dem Schließen des Neuralrohrs zwischen diesem und der Epidermis. Aus ihnen entstehen die Neuralleistenzellen (grün). (Gammill und Bronner-Fraser, 2003) (verändert)

2.2.1.2. Zelltypen des Zentralnervensystems

Durch die Bildung des Neuralrohrs entsteht ein Neuroepithel, das man von innen nach außen in drei Zonen aufteilen kann: die Ventrikulärzone, die Intermediärzone und die Marginalzone. Aus der Marginalzone entwickelt sich die weiße Substanz, in der die Axone der Neuronen verlaufen. Die Intermediärzone bildet die graue Substanz, in der sich die Zellkörper der Neuronen befinden, die sich vorher in der Ventrikulärschicht gebildet haben. Aus der Ventrikulärzone, die an das Lumen des Neuralrohrs grenzt, gehen nacheinander Neuroblasten, Glioblasten und

Ependymzellen hervor. Die Zellen dieser Zone weisen eine apikal-basale Ausrichtung auf. Die Centrosomen befinden sich beispielsweise apikal auf der dem Lumen zugewandten Seite. Während der Mitose wandern die Zellkerne dieser Zellen im Zuge des „interkinetic nuclear movements“ (INM) zwischen apikaler und basaler Seite hin und her. Dieser Aufbau des Neuralrohrs spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Neuronen und Gliazellen. Die Neuroepithelzellen der Ventrikulärschicht sind bipolare neurale Vorläuferzellen, die sich unter anderem mit Hilfe des Notch-Signalweges verständigen, wobei eine proliferierende Vorläuferpopulation erhalten bleibt und gleichzeitig durch asymmetrische Zellteilung erste Neuronen entstehen (Lewis, 1998; Louvi und Artavanis-Tsakonas, 2006). Diese neuroepithelialen Vorläuferzellen entwickeln sich nach dem Schließen des Neuralrohrs zu **radialen Gliazellen**, die eine charakteristische Morphologie aufweisen (Malatesta *et al.*, 2000). Sie besitzen einen langen basalen und einen eher kurzen apikalen Fortsatz. Der kurze Fortsatz ist mit dem Lumen des Neuralrohrs verbunden. Radiale Gliazellen entwickeln sich sowohl zu Makroglia, also Astrozyten und Oligodendrozyten, als auch zu Neuronen und Ependymzellen (Anthony *et al.*, 2004). Sie teilen sich innerhalb der Ventrikulärzone asymmetrisch: eine Tochterzelle bleibt radiale Gliazelle, die andere wird zu einem Neuronenvorläufer. Diese Vorläuferzelle migriert entlang der langen Fortsätze der radialen Gliazellen aus der Ventrikulärzone in die Intermediärzone und später auch darüber hinaus. Um die Produktion der sehr unterschiedlichen Zelltypen aus den gleichen radialen Gliazellen zu erreichen, werden Mechanismen, die die Differenzierung von radialen Gliazellen zeitlich und räumlich regulieren aktiv. Eine dorsoventrale Musterbildung des Neuralrohrs segmentiert dieses in unterschiedliche Vorläuferdomänen für verschiedene **Neuronentypen**: p0, p1 p2, p3 und pMN. Diese Musterbildung wird durch ventrale Sonic Hedgehog (SHH)- und dorsale Signale wie BMP und Wnt reguliert (Briscoe und Novitch, 2008; Ulloa und Marti, 2010) (siehe Abbildung 1.2). SHH-Signale führen zur Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren wie *Nkx2.2* und *Pax6* in den unterschiedlichen Vorläuferdomänen. Diese Faktoren reprimieren sich gegenseitig, womit die Aufrechterhaltung der Domänengrenzen gewährleistet wird. Proneurale bHLH-Proteine wie MASH1, Neurogenin1 oder MATH1 initiieren die neuronale Differenzierung. Um diese erfolgreich durchführen zu können, ist allerdings die Inhibierung der Selbsterneuerung und der Gliogenese genauso wichtig (Bylund *et al.*, 2003; Sandberg *et al.*, 2005).

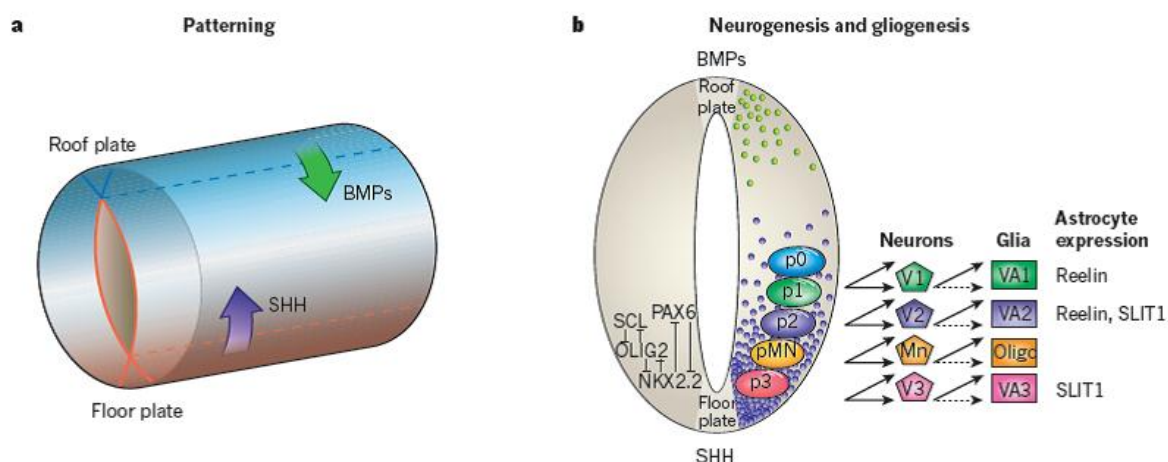


Abbildung 1.2 Musterbildung des Neuralrohrs

a) Dorsoventrale Gradienten von Sonic Hedgehog (SHH) und BMPs während der Musterbildung des Neuralrohrs

b) Vorläuferdomänen im embryonalen Neuralrohr für die Differenzierung verschiedener Neuronen- und Gliatypen.

(Rowitch und Kriegstein, 2010)

Durch Bildung der Vorläuferdomänen im Neuralrohr wird zusätzlich die Differenzierung in unterschiedliche **Gliatypen** gesteuert (Abbildung 1.2) (Rowitch und Kriegstein, 2010). Dabei geht die Entwicklung der Neuronen der von Gliazellen zeitlich voran. Der „Switch“ von Neuron- zu Gliadifferenzierung ist ein aktuelles Feld der Forschung (Rowitch und Kriegstein, 2010). Gut untersucht ist die Produktion von Oligodendrozyten ausgehend von Vorläufern der pMN-Domäne, die zuvor Motoneuronen hervorgebracht hat. Der proneurale bHLH-Transkriptionsfaktor NGN2 reprimiert die Gliogenese dieser Vorläuferzellen. Kurz vor dem „Switch“ zur Oligodendrozytendifferenzierung wird NGN2 herunterreguliert (Lee *et al.*, 2005). Der Notch-Signalweg spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Umschaltung von Neuro- zu Gliogenese. Dabei führt sein Ausschalten zum Ausfall der Oligodendrozytenproduktion und seine Aktivierung zur Blockade der Motorneuronendifferenzierung und übermäßiger Differenzierung in Oligodendrozyten (Itoh *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006). Zusätzlich sind progliale Faktoren wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor *Sox9* und die „Nuclear factor I (NFI) genes“ am „Switch“ zur Gliogenese beteiligt (Deneen *et al.*, 2006; Esain *et al.*, 2010). Im Vorderhirn spielt der Methylierungsstatus von Genen wie *GFAP* und *SL100B* eine Rolle. Diese Promotoren sind zuerst methyliert und daher inaktiv. Später werden sie demethyliert und sind dann in der Lage, auf Cytokinsignale zu reagieren (Takizawa *et al.*, 2001). Notch ist auch hier am „Switch“ zur Gliogenese beteiligt. Einerseits durch die Aktivierung der Expression von HES-Proteinen, die proneurale bHLH-Proteine inhibieren und andererseits durch die Aktivierung des JAK-STAT Signalweges, was zur Demethylierung von astrozyten-spezifischen Genen führt (Rowitch und

Kriegstein, 2010). Auch Zytokine der IL6-Familie und BMPs spielen bei der Induktion der Gliogenese eine Rolle (Rowitch und Kriegstein, 2010).

Radiale Gliazellen entwickeln sich zu TypB-Zellen in der Subventrikulärzone des **adulten Gehirns** (Ihrie und Alvarez-Buylla, 2008). Die Subventrikulärzone (SVZ) entlang der Wände der lateralen Ventrikel ist eine der beiden bisher bekannten Regionen im adulten Säugerhirn, die neurale Vorläuferzellen enthalten (Lois und Alvarez-Buylla, 1993). Die andere ist die subgranuläre Zone im Gyrus dentatus des Hippocampus (Gage *et al.*, 1998). TypB-Zellen sind langsam proliferierende adulte neurale Stammzellen mit den strukturellen und biologischen Eigenschaften von Astrozyten, was wahrscheinlich ein Grund dafür ist, dass sie bis in die 1990er Jahre weitestgehend unentdeckt blieben. Sie erneuern sich selbst und produzieren gleichzeitig TypC-Zellen, die sich schnell aktiv teilen und sich wiederum zu unausgereiften Neuroblasten, den TypA-Zellen, entwickeln. Diese Neuroblasten migrieren über den „rostral migratory stream“ in den Riechkolben (olfaktorischer Bulbus) und differenzieren in Interneurone oder Oligodendrozyten (Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Menn *et al.*, 2006). Dies ist ein Weg auf dem im Rahmen der adulten Neurogenese neue Neuronen und Gliazellen erzeugt werden können, die sich beispielsweise an der Regeneration von beschädigten Gehirnarealen, am Lernen oder am Speichern von Erinnerungen beteiligen könnten. Die weitere Erforschung der adulten Neurogenese könnte zu neuen Erkenntnissen im Bereich der Gehirnentwicklung, Gehirntumoren und neurodegenerativer Krankheiten führen (Ihrie und Alvarez-Buylla, 2008).

2.2.2. Die Entwicklung der Neuralleiste

Die Neuralleiste ist eine transiente embryonale Struktur, die nur in Chordaten gefunden wurde und häufig als das vierte Keimblatt bezeichnet wird (Hall, 2000). Neuralleistenzellen entstehen an der Grenze zwischen Neuralplatte und nicht-neuralem Ektoderm. In der Maus beginnen sie sich von den Neuralfalten zu lösen und durchlaufen eine EMT (Epitheliale-mesenchymale Transition) bevor das Neuralrohr sich geschlossen hat. Anschließend migrieren sie an unterschiedliche Zielorte im ganzen Embryo, wo sie sich in verschiedenste Zelltypen entwickeln. Dies sind unter anderem: Neuronen und Gliazellen des peripheren Nervensystems, Chondrozyten, Melanozyten, Herzmuskelzellen, endokrine Zellen und Bindegewebe. Sowohl an der Spezifizierung der Neuralleistenzellen als auch an ihrer späteren Differenzierung sind Signalwege und -moleküle wie BMP, FGF, Notch, Retinolsäure und Wnt beteiligt. Sie aktivieren die Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Grenze der Neuralleiste zu den umliegenden Geweben festlegen. Zu ihnen gehören *Msx1*, *Msx2*, *Pax3*, *Pax7* und *Zic1*. Diese Faktoren regulieren wiederum zusammen mit Signalmolekülen die Expression von Genen, die an der Spezifizierung der Neuralleiste mitwirken, wie *AP-2*, *FoxD3*, *Snail2*, *Snail1*, *Id3*, *Sox9* und *Sox10*. Anschließend

spielen Gene wie *Sox9*, *Sox10*, *Cad7*, *Col1a*, *Ngn1*, *Mitf*, *Dct* und viele andere eine Rolle bei der Migration und der weiteren Differenzierung der Neuralleistenzellen (Steventon *et al.*, 2005; Sauka-Spengler und Bronner-Fraser, 2008; Betters *et al.*, 2010). *Sox10* ist beispielsweise an der Differenzierung in Melanozyten, Schwannzellen, Nerven des parasymphatischen, sympathischen, sensorischen und enterischen Nervensystems beteiligt. *Sox9* spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Chondrozyten, Melanozyten und Herzmuskelzellen (Sauka-Spengler und Bronner-Fraser, 2008; Haldin und LaBonne, 2010).

2.3. Notch

Die erste Entdeckung von Notch stammt aus dem Jahr 1919 (Mohr, 1919). Otto L. Mohr fand Einkerbungen („notch wings“) an den Flügelrändern von *Drosophila melanogaster*, die eine Haploinsuffizienz für das *Notch*-Gen aufwiesen. Mittlerweile ist der Notch-Signalweg gut charakterisiert und es ist bekannt, dass er eine stark kontextabhängige Rolle bei verschiedensten Prozessen während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus spielt. So ist er an Apoptose, Proliferation und vielfältigen Zelllinienentscheidungen in allen drei beziehungsweise vier Keimblättern beteiligt.

2.3.1. Notch-Rezeptoren

In der Maus sind bis heute vier Notch-Rezeptoren, Notch1-4, bekannt. Diese Rezeptoren besitzen einen fast gleichen Aufbau (Abbildung 1.3) (Bolos *et al.*, 2007; Zanotti und Canalis, 2010). Es handelt sich um heterodimere Transmembranrezeptoren, die zunächst als ca. 300 kDa große Aminosäurekette synthetisiert werden und anschließend im Golgi-Apparat durch eine Furin-ähnliche Protease in eine intra- und eine extrazelluläre Domäne gespalten werden. Diese beiden Domänen lagern sich nahe der Zellmembran aneinander. Im extrazellulären Teil befinden sich 29 bis 36 EGF-ähnliche Wiederholungen (*Epidermal growth factor*), die unterschiedlich glykosyliert sein können und an die die Bindung der Liganden erfolgt (Cordle *et al.*, 2008). Außerdem befinden sich hier drei LNRs (Lin-12, Notch repeats), die die ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors inhibieren. Der intrazelluläre Teil des Notch-Rezeptors besteht aus der RAM23-Domäne, die an der Bindung an RBP-J beteiligt ist (Tamura *et al.*, 1995). Anschließend finden sich zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS), die sieben Ankyrin-Wiederholungen umfassen, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Blank *et al.*, 1992). Am C-Terminus des intrazellulären Bereichs von Notch befindet sich eine OPA- und eine PEST-Sequenz, die für den Abbau des Rezeptors verantwortlich sind (Rechsteiner, 1988). Direkt davor enthalten einige Notch-Rezeptoren eine Transaktivierungsdomäne (TAD) (Kurooka *et al.*, 1998). Drei zusätzliche funktionale Regionen des intrazellulären Notch-Rezeptors sind seit kurzem bekannt: PPD

(*potential phosphorylated domain*), DTS (*downregulation targeting sequence*) und S4 (Borggreffe und Oswald, 2009). PPD befindet sich zwischen den Ankyrin-Wiederholungen und der PEST-Domäne und verstärkt die Bindung von Notch an RBP-J (Le Gall und Giniger, 2004). DTS ist an Endozytose-Prozessen von Notch und an der Kommunikation mit dem Ras-Signalweg beteiligt (Shaye und Greenwald, 2005). S4 ist eine C-terminale Phosphorylierungsstelle, die für den Abbau von Notch zuständig ist.

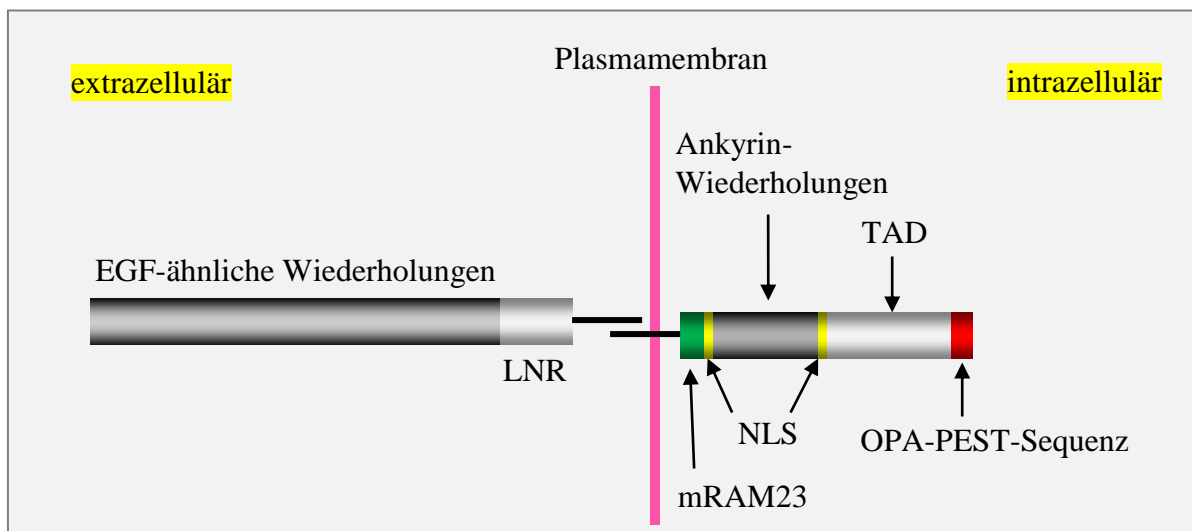


Abbildung 1.3 Aufbau des Notch1-Rezeptors

Schematische Darstellung des Aufbaus des murinen Notch1-Rezeptors mit den wichtigsten Domänen. EGF: Epidermal growth factor; LNR: LIN12 Notch-repeats; NLS: Kernlokalisationssequenz; TAD: Transaktivierungsdomäne

2.3.2. Notch-Liganden

In Säugetieren sind fünf kanonische Notch-Liganden bekannt: Jagged 1 und 2 und Delta-like 1,3 und 4. Die Namen leiten sich von den beiden Notch-Liganden Delta und Serrate aus *Drosophila melanogaster* ab. Die beiden Jagged-Liganden sind Homologe zu Serrate und die Delta-like Liganden zu Delta. Alle diese kanonischen Liganden sind wie der Notch-Rezeptor Transmembranproteine, was bedeutet, dass klassisch zwischen zwei Nachbarzellen kommuniziert wird. Im extrazellulären Teil besitzen die Liganden eine unterschiedliche Anzahl an EGF-ähnlichen Wiederholungen, eine DSL (Delta, Serrate, Lag2)-Domäne und im Fall der Jagged-Liganden eine cysteinreiche Domäne (Bolos *et al.*, 2007). Die intrazellulären Bereiche der Liganden unterscheiden sich zum Teil erheblich (Pintar *et al.*, 2007). Zusätzlich zu den kanonischen Liganden sind nicht-kanonische Liganden bekannt, die entweder Transmembranproteine oder sekretierte Proteine sind, wie zum Beispiel Delta homologue-like 1 (Dlk1 oder Pref1), der den Delta-like Liganden ähnelt, dem aber die DSL-Domäne fehlt. Dieser Ligand inhibiert den Notch-Signalweg, indem er an die Notch-Rezeptoren bindet (Baladron *et al.*, 2005).

2.3.3. Der klassische Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg wird durch die Bindung des Liganden an den Notch-Rezeptor initiiert (Abb. 1.4). Dabei erfolgt nach der eigentlichen Bindung eine endozytotische Internalisierung des an den extrazellulären Teil des Notch-Rezeptors gebundenen Liganden (Zanotti und Canalis, 2010). Es wird vermutet, dass diese „ziehende Kraft“ dazu beiträgt, dass die Heterodimerisierungsdomäne freigelegt wird, was dazu führt, dass die S2-Schnittstelle erkannt und das Protein durch die ADAM-Protease (*a disintegrin and metalloprotease domain*) TACE (*tumor necrosis factor- α -converting-enzyme*) geschnitten wird. Dadurch wird ein instabiles Protein erzeugt, das durch den γ -Sekretase Komplex erkannt und an der Schnittstellen S3 und S4 in der Membran geschnitten wird. Dies führt zur Freisetzung des intrazellulären Teils des Notch-Rezeptors (NICD) in das Cytoplasma. NICD kann nach anschließender Translokation in den Zellkern an sein Effektormolekül RBP-J binden und damit seine Zielgene aktivieren. In Abwesenheit von NICD bindet RBP-J an den Promotor der Zielgene und ist mit Korepressor-Proteinen assoziiert. Diese rekrutieren Histondeacetylase-Komplexe (HDACs), um die Transkription der Zielgene zu inhibieren. Durch Bindung von NICD an RBP-J werden die Korepressoren verdrängt und Aktivatoren wie Mastermind-Like (MAML) und Histonacetyltransferasen rekrutiert (Zanotti und Canalis, 2010). Auf diese Art und Weise wird die Repression der Zielgene in eine Aktivierung umgewandelt. Bekannte Zielgene des Notch-Signalweges sind die bHLH-Transkriptionsfaktoren *Hairy and Enhancer-of-Split- (Hes)* und *Hey* in *Drosophila melanogaster* und die Homologe *Hes* und *Hey* in Säugetieren.

Die Prozesse des Notch-Signalweges unterscheiden sich zum Teil erheblich von denen anderer Signalwege. Der Rezeptor wird proteolytisch gespalten, was dazu führt, dass er ein Signal nur ein einziges Mal übertragen kann, es gibt keine Phosphorylierungen und keine bekannten Verstärkungskaskaden. Der Rezeptor selbst tritt in den Zellkern ein und aktiviert seine Zielgene.

Neben diesem kanonischen Notch-Signalweg wurden auch RBP-J-unabhängige Aktivierungen von Notch beschrieben. Bei einem dieser Wege spielt die Ubiquitin-Ligase Deltex eine entscheidende Rolle (Hori *et al.*, 2004). Ein anderer Weg beinhaltet die Aktivierung der AktS473-Kinase durch NICD im Cytoplasma (Perumalsamy *et al.*, 2009).

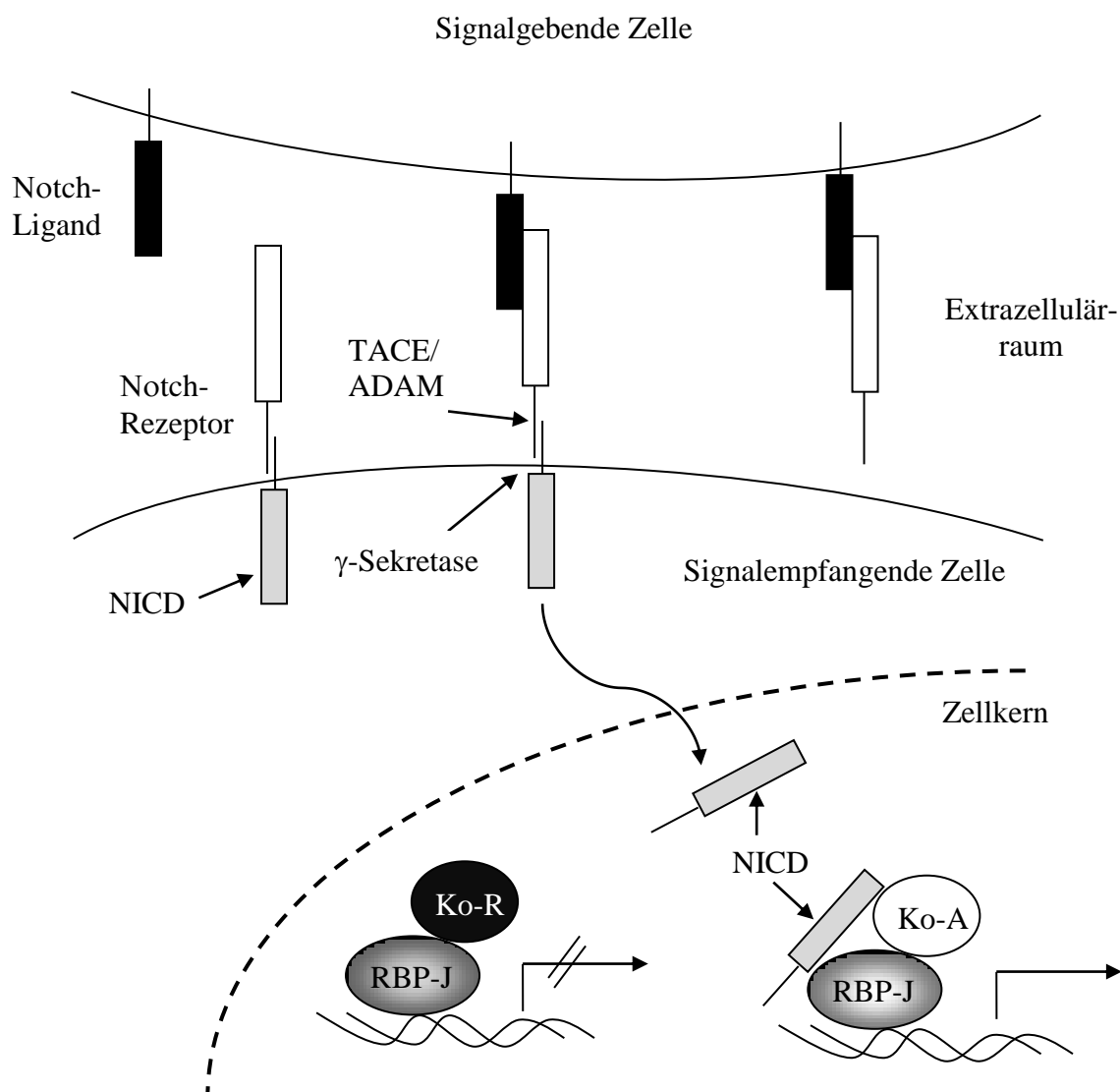


Abbildung 1.4 Der klassische Notch-Signalweg

Schematische Darstellung des klassischen Notch-Signalweges. Die Bindung des Liganden bewirkt die Aktivierung des Rezeptors. Der intrazelluläre Teil wird abgespalten, transloziert in den Nukleus und bindet an RBP-J, wodurch Korepressoren verdrängt, Koaktivatoren rekrutiert werden und die Transkription der Zielgene aktiviert wird. Ko-A: Koaktivatoren; Ko-R: Korepressoren; NICD: Notch intrazelluläre Domäne; TACE: tumor necrosis factor- α -converting-enzyme

2.3.4. Die Regulation des Notch-Signalweges

Notch nimmt sehr vielfältige Funktionen während der Entwicklung und in verschiedenen zellulären Prozessen wahr. Um diese zu koordinieren, ist eine präzise Regulation dieses Signalweges notwendig. Dazu gehören die zeitliche und räumliche Regulation der Expression der einzelnen Notch-Rezeptoren und ihrer Liganden, aber auch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen (Zanotti und Canalis, 2010). Die Level der Rezeptoren und ihrer Liganden spielen vor allem beim Mechanismus der „Lateralen Inhibition“, bei dem Zellen, die ursprünglich der gleichen Ausgangspopulation angehören durch Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren in unterschiedliche Richtungen differenzieren, eine erhebliche Rolle.

Die O-Fucosyltransferase Pofut1 ist essentiell für die Glykosylierung des extrazellulären Teils des Notch-Rezeptors. Diese Glykosylierung spielt sowohl bei der Ligandenbindung als auch beim Transport von Notch zur Plasmamembran eine Rolle (Rampal *et al.*, 2005). Zusätzlich dazu ist Pofut1 an der korrekten Faltung des Notch-Proteins beteiligt (Stahl *et al.*, 2008). Glykosyltransferasen der Fringe-Familie (Lunatic Fringe, Maniac Fringe und Radical Fringe) können die Glykosylierungen erweitern und dadurch die Affinität der Notch-Rezeptoren zum Delta-like 1 Liganden verstärken, die zum Jagged1 Liganden inhibieren (Stanley, 2007).

Auch die Endozytose des Rezeptors und seines Liganden in die ligandenexprimierende Zelle stellt eine Möglichkeit der Regulation dar. Auf diese Art und Weise werden Liganden recycelt und können anschließend wieder in die Plasmamembran eingelagert werden. Für diesen Prozess wird die intrazelluläre Domäne der Liganden durch Ubiquitin-Ligasen ubiquitiniert. Zwei dieser Ligasen wurden identifiziert: Neuralized1 und Mind Bomb1 (Zanotti und Canalis, 2010). Auch die Notch-Rezeptoren werden durch Endozytose reguliert. Cbl, eine *Really Interesting New Gene* (RING) *finger* E3 Ubiquitin-Ligase steuert beispielsweise die Degradation von Notch in Abwesenheit von Ligandenbindung (Jehn *et al.*, 2002), während Itch, eine murine E3 Ubiquitin-Ligase, die Degradation von Notch1 im Lysosom fördert (Chastagner *et al.*, 2008). Anstatt degradiert zu werden, können Notch-Rezeptoren aber auch nach Endozytose recycelt werden. An diesem Prozess ist eine weitere RING E3 Ubiquitin-Ligase beteiligt: Deltex (Mukherjee *et al.*, 2005).

Numb ist ein Protein, das ebenfalls an der Regulation des Notch-Signalweges mitwirkt. Numb ist ein membranassoziierter phosphotyrosinbindender Inhibitor von Notch, der bei der Zellteilung asymmetrisch auf die Tochterzellen aufgeteilt wird und damit die Differenzierung bis dahin gleicher Ausgangszellen in eine bestimmte Richtung fördert oder inhibiert. Als Mechanismus der Notch-Inhibition kommt eine indirekte Beteiligung an der Ubiquitinierung von Notch in Frage (McGill und McGlade, 2003). Andere Mechanismen werden diskutiert (Fortini, 2009).

2.3.5. Funktionen von Notch

Der Notch-Signalweg nimmt sehr vielfältige Funktionen in zellulären Prozessen wie Apoptose und Proliferation sowie bei einer großen Vielfalt von entwicklungsbiologischen Zelllinienentscheidungen im Embryo und auch im adulten Organismus, beispielsweise beim Erhalten von Stammzellcharakter, wahr (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Lai, 2004; Le Borgne *et al.*, 2005; Bray, 2006). Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit interessante Rolle von Notch während der embryonalen Neurogenese eingegangen.

2.3.5.1. Funktionen von Notch in der embryonalen Neurogenese

In vitro-Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Aktivierung des Notch-Signalweges in embryonalen Stammzellen zu einer schnelleren und ausschließlichen Determinierung in neuroektodermale Zelllinien führt und umgekehrt das Ausschalten von Notch die Spezifizierung in neuroektodermale Zelllinien reprimiert (Lowell *et al.*, 2006). Die Bildung von radialen Gliazellen, neuralen Vorläuferzellen, wird durch die Expression von *Notch1* gefördert (Gaiano *et al.*, 2000). Die Inaktivierung von Notch während der Entwicklung von Vertebraten führt zu vorzeitiger Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen in Neuronen und damit zu einem vorzeitigen Abbau des neuralen Stammzellpools, was den Schluss nahelegt, dass Notch für die Aufrechterhaltung von Stammzell- oder Vorläufercharakter während der neuralen Differenzierung und die Inhibierung der weiteren neuronalen Differenzierung verantwortlich ist (Bolos *et al.*, 2007; Cau und Blader, 2009). *Notch1* war das erste Gen des Notch-Signalweges, das mit Hilfe von homologer Rekombination in Mäusen deletiert wurde (Swiatek *et al.*, 1994; Conlon *et al.*, 1995). Homozygote *Notch1*-Knockout Mäuse sterben vor dem Tag 11,5 der embryonalen Entwicklung (Swiatek *et al.*, 1994). Während der ersten neun Tage der Embryonalentwicklung entwickeln sie sich phänotypisch weitestgehend normal. Danach lässt sich jedoch ein Wachstums- und Entwicklungsstopp des gesamten Embryos und verstärkter Zelltod, vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem, feststellen. Homozygote *Notch1*-Deletionsmutanten weisen eine vorzeitige neuronale Differenzierung (de la Pompa *et al.*, 1997), Störungen der Somitogenese (Swiatek *et al.*, 1994; Conlon *et al.*, 1995) und Defekte in kardiovaskulärer Entwicklung (Swiatek *et al.*, 1994) auf. Die Expression von Genen wie *Hes1*, *Hes5* und *Delta1* und von Differenzierungsmarkern wie *NeuroD*, *Math4A* und *NSCL-1* wurde untersucht (de la Pompa *et al.*, 1997). Wie erwartet, war die Expression der frühen Differenzierungsmarker in *Notch1*-Mutanten erhöht und die von *Hes5* verringert. Die Expression des bekannten Notch-Zielgen *Hes1* jedoch war durch die Deletion von *Notch1* nicht beeinflusst. Auch Deletionen von *Notch1* in verschiedenen Gehirnregionen resultierten in verstärkter neuronaler Differenzierung, Heraufregulierung von proneuralen Differenzierungsgenen wie *Mash1* und *Math1*, vorzeitigem Abbau des neuralen Stammzellpools und damit in weniger Neuronenbildung (Lutolf *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2004). Die Wirkung von Notch wird hier durch den Mechanismus der „Lateralen Inhibition“ erreicht. In einer Vorläuferpopulation werden die Zellen, die den Liganden Delta exprimieren zu Neuronen und sorgen gleichzeitig dafür, dass ihre Nachbarzellen daran gehindert werden, ebenfalls in Neuronen zu differenzieren (Lewis, 1998).

Zusätzlich dazu gibt es Hinweise darauf, dass Notch nicht nur den Vorläufercharakter von neuralen Zellen erhält, sondern auch ihre Differenzierung in verschiedene Richtungen beeinflusst. Ein homogener Pool von Stammzellen wird durch Notch-Aktivität also zu heterogenen

Ausgangszellen unterschiedlicher Populationen spezifiziert. Dabei nimmt Notch beispielsweise Einfluss auf die Zelllinienentscheidung zwischen verschiedenen Neuronentypen (Del Barrio *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2007). *In vitro* konnte durch die Deletion des Liganden *Delta1* festgestellt werden, dass Notch zuerst die Differenzierung in Gliavorläuferzellen fördert und anschließend die Zelllinienentscheidung zwischen Oligodendrozyten und Astrozyten zugunsten von Astrozyten beeinflusst (Grandbarbe *et al.*, 2003). Während Notch die Differenzierung in Neuronen inhibiert, fördert es die in Gliazellen (Tanigaki *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2007). Notch ist am „Switch“ von der Differenzierung neuraler Stammzellen in Neuronen zu ihrer Differenzierung in Gliazellen beteiligt (Rowitch und Kriegstein, 2010). Aus der pMN-Vorläuferdomäne (siehe Abb. 1.2) können sich ohne Notch keine Oligodendrozyten entwickeln, während bei Notch-Aktivierung die Differenzierung in Motoneuronen inhibiert und ein Überschuss an Oligodendrozyten produziert wird (Itoh *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006). Die Aktivierung von Notch führt zur Demethylierung der STAT3-Bindestelle in Promotoren von gliaspezifischen Genen wie *GFAP* und *S100 β* (Namiyama *et al.*, 2009). Diese Aktivierung wird von jungen Neuronen, die sich bis zu diesem Zeitpunkt aus den neuralen Stammzellen gebildet haben und die die Notch-Liganden *Jagged1* und *Delta-like1* exprimieren induziert (Namiyama *et al.*, 2009). Auf diese Weise werden gliaspezifische Gene empfänglich für ihre Aktivierung durch den JAK-STAT-Signalweg.

Eine weitere Funktion des Notch-Signalweges während der embryonalen Neurogenese ist sein Einfluss auf die Bildung der Neuralleiste. Die Spezifizierung der Neuralleiste erfolgt durch BMP4. Mittlere Level von BMP4 führen zur Bildung von Neuralleistenzellen am Rand der Neuralplatte, während hohe Level zur Bildung von nicht neuralem Ektoderm und niedrige Level zur Induktion der Neuralplatte führen. In Vögeln und Fröschen ist Notch oberhalb von BMP4 an der Spezifizierung der Neuralleiste und an ihrer Begrenzung am Rand der Neuralplatte beteiligt (Endo *et al.*, 2002). Die Aktivierung des Notch-Signalweges oder die Überexpression seines Zielgens *Hairy2* in *Xenopus laevis* führt zur Erweiterung der Neuralleiste an der Grenze zur Neuralplatte (Glavic *et al.*, 2004). Dabei hat Notch unterschiedliche Wirkmechanismen in verschiedenen Spezies: In *Xenopus laevis* und *Danio rerio* erniedrigt es die BMP4-Expression, in Vögeln erhöht es sie, um das richtige Level für die Induktion der Neuralleiste zu erreichen (Glavic *et al.*, 2004). In der Maus führt ein Ausschalten von *Sox9* zur Apoptose der Neuralleistenzellen kurz nach ihrer Spezifizierung (Cheung *et al.*, 2005). Nach der Induktion der Neuralleiste bewirkt Notch auch im peripheren Nervensystem einen irreversiblen „Switch“ von der Differenzierung in autonome oder sensorische Neuronen zur Differenzierung in Schwannzellen (Morrison *et al.*, 2000; Wakamatsu *et al.*, 2000).

Während der Entwicklung der Neuralleiste spielt Notch zusätzlich eine Rolle in der Induktion der Differenzierung von Chondrozyten (Nakanishi *et al.*, 2007), in der Differenzierung von

Herzzellen (High *et al.*, 2007), Melanozyten (Moriyama *et al.*, 2006) und der weiteren Differenzierung von sympathischen Neuronen (Tsarovina *et al.*, 2008).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Notch zuerst die Entwicklung von neuroektodermalen Zellen gegenüber mesodermalen oder endodermalen Zelltypen begünstigt, anschließend neurale Stamm- und Vorläuferzellen erhält, ihre Differenzierung in Neuronen inhibiert und ihre Entwicklung in Gliazellen fördert. Zusätzlich ist es an verschiedenen Zelllinienentscheidungen zwischen unterschiedlichen Neuronentypen und zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten beteiligt (siehe auch Abbildung 1.5). Es spielt außerdem eine Rolle bei der Induktion der Neuralleiste und fördert die Differenzierung von Schwannzellen aus Schwannzellvorläufern.

2.4. Der Transkriptionsfaktor *Sox9*

Der Transkriptionsfaktor *Sox9* gehört zur „sex determinig region (SRY)-related HMG-box (SOX)“-Familie. Innerhalb dieser Familie wird er zusammen mit *Sox8* und *Sox10* der SoxE-Gruppe zugeordnet. *Sox9* hat unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung verschiedener Gewebe und Organe. So spielt es im zentralen Nervensystem, in der frühen Neuralleistenentwicklung und der Differenzierung einiger ihrer Derivate, in der Knorpelentwicklung und in pankreatischen Vorläuferzellen eine Rolle. *Sox9* wurde als direktes Zielgen von Notch1 identifiziert (Meier-Stiegen *et al.*, 2010).

In der **Neuralleistenentwicklung** spielt *Sox9* bereits sehr früh eine entscheidende Rolle. Direkt nachdem die Neuralleistenzellen am Rand der Neuralplatte spezifiziert wurden, wird *Sox9* in etwa zeitgleich mit *Foxd3* als einer der frühesten Neuralleistenmarker in diesen Zellen exprimiert (Hong und Saint-Jeannet, 2005). Expression von *Sox9* in Neuralrohren des Huhns führt zur Induktion von Neuralleistenmarken auf Kosten von Differenzierung in Zellen des zentralen Nervensystems (Cheung und Briscoe, 2003). Ektopische Expression von sowohl *Sox9* als auch *Sox8* oder *Sox10* führt zur Bildung von Neuralleistenvorläuferzellen, was auf eine funktionale Redundanz der SoxE-Proteine hindeutet (Kelsh, 2006). *Sox9* scheint außerdem wichtig für eine funktionierende Migration der Neuralleistenvorläuferzellen und für ihr anschließendes Überleben zu sein (Cheung *et al.*, 2005). In migrierenden Neuralleistenvorläuferzellen wird seine Expression zunächst herunterreguliert, in einigen Derivaten aber später wieder exprimiert. Gut untersucht ist seine Rolle in Chondrozyten, die entweder mesodermalen Ursprungs sind oder von Neuralleistenvorläuferzellen ausgehend differenzieren (Haldin und LaBonne, 2010). In beiden Differenzierungswegen ist *Sox9* entscheidend an der Chondrozytenentwicklung beteiligt. Es aktiviert direkt die Expression von *Typ II Collagen (Col2a1)*, eines der wichtigsten Collagen-Proteine während der Chondrozytenentwicklung. Außerdem konnte mehrfach gezeigt werden,

dass die Deletion von *Sox9* zu Knorpel-Defekten führt (Akiyama *et al.*, 2002; Spokony *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2005). Anhand von *Sox9*-Expressionsstudien im Huhn konnte festgestellt werden, dass *Sox9*-exprimierende Zellen während der Neuralleistendifferenzierung von einer Entwicklung in Neuronen ausgeschlossen sind, sich aber in Zellen mit glia- oder melanozytentypischen Eigenschaften entwickeln (Cheung und Briscoe, 2003). Zusammen mit *Sox10* ist *Sox9* zusätzlich an der Differenzierung von Melanozyten und Derivaten von Neuralleistenzellen im Herzen beteiligt (Akiyama *et al.*, 2004; Taylor und Labonne, 2005).

Im **zentralen Nervensystem** spielt *Sox9* eine essentielle Rolle in der Gliogenese. Seine Expression startet kurz vor der Gliogenese in neuralen Vorläuferzellen des Rückenmarks und bleibt während der Oligodendrozytendifferenzierung bis zum Stadium der Oligodendrozytenvorläufer erhalten, muss aber für die weitere Differenzierung herunterreguliert werden. In der Astrozytenentwicklung bleibt die *Sox9*-Expression bis in ausgereifte adulte Astrozyten erhalten (Stolt und Wegner, 2010). Konditionale Deletionsexperimente in der Maus deuten darauf hin, dass *Sox9* für die Spezifizierung von Gliazellen verantwortlich ist. Sein Ausschalten führt zu einer Reduktion von spezifizierten Oligodendrozyten und Astrozyten und zur gleichzeitigen Überproduktion von Motorneuronen und V2-Interneuronen, was darauf schließen lässt, dass *Sox9* in die Zelllinienentscheidung zwischen Motoneuronen und Oligodendrozyten beziehungsweise Astrozyten und V2-Interneuronen eingreift (Stolt *et al.*, 2003). Zusätzlich zu seiner Rolle während der Gliogenese nimmt *Sox9* Funktionen bei der Induktion und der Erhaltung von neuralen Stammzellen wahr. Seine Induktion ist ausreichend und notwendig, um die Bildung von neuralen Stammzellen sowohl im embryonalen als auch im adulten zentralen Nervensystem der Maus *in vivo* zu initiieren (Scott *et al.*, 2010).

Eine weitere Funktion von *Sox9* liegt in der Erhaltung von **Pankreas**vorläuferzellen in einem undifferenzierten Stadium (Seymour *et al.*, 2007).

Die unterschiedlichen Funktionen von *Sox9* werden durch verschiedene Mechanismen reguliert. Daran beteiligt sind unter anderem Mitglieder der SoxD-Gruppe: *Sox5*, *L-Sox5* und *Sox6*. Sie binden zusammen mit *Sox9* am Col2A1-Enhancer in Chondrozyten und verstärken so die Aktivierung von Col2A1 (Lefebvre *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001). Auch posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung von *Sox9* spielen eine regulatorische Rolle. Sie beeinflusst die Bindung an DNA und die Kernlokalisation (Huang *et al.*, 2000; Malki *et al.*, 2005). Zudem wirkt die Modifikation durch SUMO-Proteine (*small ubiquitin-like modifier*) regulierend auf *Sox9*. Diese Proteine werden ähnlich dem Ubiquitin als Modifikation an Proteine angehängt und haben unterschiedlichste Wirkungen (Gill, 2004). SUMOylierung von *Sox9* und *Sox10* verwandelt diese Transkriptionsfaktoren zu transkriptionellen Repressoren und führt so zur reduzierten Induktion der Neuralleiste und vermehrter Bildung von Zellen des zentralen Nervensystems (Taylor und Labonne, 2005). Eine zusätzliche Möglichkeit der Regulation der

Sox9-Aktivität besteht in seiner Zusammenarbeit mit anderen Signaltransduktionswegen, wie zum Beispiel dem Wnt-Signalweg. Es konnte gezeigt werden, dass Sox9 mit β -Catenin interagiert und seine Aktivität herunterreguliert (Akiyama *et al.*, 2004). In der adulten Neurogenese wurde die *Sox9*-mRNA als Ziel der miRNA miR-124 identifiziert, was eine weitere Ebene der Regulation darstellt (Cheng *et al.*, 2009).

2.5. Der Transkriptionsfaktor *Pax6*

Der Transkriptionsfaktor *Pax6* (*paired box 6*) ist hochkonserviert zwischen verschiedenen Spezies und spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystem und pankreatischen Inselzellen (St-Onge *et al.*, 1997). Gut untersucht ist seine Rolle in der Entwicklung des Rückenmarks, des zerebralen Cortex (Großhirnrinde) und vor allem des Auges (Grindley *et al.*, 1995; Gehring und Ikeo, 1999; Ashery-Padan und Gruss, 2001). *Pax6*-Mutanten haben unter anderem Defekte in der Proliferation von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen, der Neurogenese, der Produktion von spezifischen Neuronentypen und in der Musterbildung des Neuralrohrs (Osumi *et al.*, 2008). Im Neocortex führt der Verlust von *Pax6* zu Mikrozephalie, veränderter Entwicklung von TypB-Zellen des adulten Gehirns und einer Reduktion von sich später entwickelnden Neuronen (Sansom *et al.*, 2009). Homozygote *Pax6*-Mausmutanten haben keine Augen und keine Nase und sterben kurz nach der Geburt (Hogan *et al.*, 1986). In der Maus ist die Expression von *Pax6* als erstes in neuroepithelialen Zellen detektierbar, kurz bevor diese sich zu radialen Gliazellen entwickeln, wobei zu beachten ist, dass es *Pax6*-positive und *Pax6*-negative radiale Gliazellen gibt. Radiale Gliazellen in bestimmten Gehirnbereichen exprimieren kein *Pax6* (Gotz *et al.*, 1998) und aus *Pax6*-defizienten ES-Zellen lassen sich radiale Gliazellen generieren, die sich dann zu GABAergen allerdings nicht mehr zu glutamatergen Neuronen entwickeln können (Nikoletopoulou *et al.*, 2007). Die *Pax6*-Expression bleibt in radialen Gliazellen bis in die TypB-Zellen des adulten Gehirns erhalten. Dort findet sich *Pax6*-Expression ebenfalls in Neuronen verschiedener Hirnareale. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass die Überexpression von *Pax6* in embryonalen Stammzellen ihre Differenzierung in neuroepitheliale Vorläuferzellen fördert. Weitere Überexpression von *Pax6* in neuroepithelialen Vorläuferzellen führt zu fortschreitender Differenzierung in radiale Gliazellen, vermehrter Bildung von Neuronen und verstärkter Migration von jungen Neuronen aus Vorläuferzellenkolonien heraus, während der Knockdown von *Pax6* in neuroepithelialen Zellen die weitere Differenzierung in radiale Gliazellen reprimiert (Suter *et al.*, 2009). *In vivo* Untersuchungen deuten darauf hin, dass *Pax6* für die Erhaltung des neuronalen Stammzellpools wichtig ist, die vorzeitige Differenzierung inhibiert und anschließend die Entwicklung in Neuronen fördert (Philips *et al.*, 2005; Quinn *et al.*, 2007). Es ist zusätzlich in Astrozyten und Astrozytenvorläufern exprimiert. Während der Entwicklung

von Astrozyten scheint es die Proliferation von Astrozytenvorläufern zu inhibieren und ihre Differenzierung in ausgereifte Astrozyten zu fördern (Sakurai und Osumi, 2008).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Pax6 für die neurale Spezifizierung von embryonalen Stammzellen und ihre weitere Differenzierung in radiale Gliazellen verantwortlich ist, aber auch an der Entwicklung von Neuronen aus radialen Gliazellen und an der Ausreifung von Astrozyten beteiligt ist. Ob es zur Erhaltung von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen oder aber zu deren weiteren neuronalen Differenzierung beiträgt, ist kontextabhängig. Zusätzlich spielt es eine Rolle in der Migration von jungen Neuronen und der Musterbildung des Neuralrohrs.

Die Aktivität von Pax6 wird auf unterschiedliche Arten reguliert (Osumi *et al.*, 2008). Eine Ebene stellen die drei Isoformen des Proteins dar: „kanonisches“ Pax6, Pax6(5a) und Pax6(Δ PD), dem die *paired domain* fehlt. Pax6(5a) besitzt im Vergleich zum „kanonischen“ Pax6 das zusätzliche Exon 5a. Es besteht aus 14 zusätzlichen Aminosäuren, die sich in der *paired domain* befinden und damit die DNA-Bindeigenschaften des Proteins verändern. Die Isoformen werden in unterschiedlicher Konzentration in der frühen Neurogenese exprimiert. Haubst und Kollegen zeigten 2004 in *in vitro*-Mausstudien, dass eine retrovirale Überexpression von „kanonischem“ Pax6 zu einer vermehrten Bildung von Neuronen auf Kosten von Gliazellen aus neuronalen Vorläuferzellen führte und außerdem die Zellproliferation inhibierte (Haubst *et al.*, 2004). Die Überexpression von Pax6(5a) hingegen inhibierte ausschließlich die Proliferation ohne Zelllinienentscheidungen während der Neurogenese zu beeinflussen. Im Gegensatz zu dieser Studie verwendeten Shimizu und Kollegen 2009 murine embryonalen Stammzellen, in denen die Expression der beiden humanen Isoformen durch Tetrazyklin im Medium unterdrückt wurde und damit durch Entzug von Tetrazyklin konditionell aktiviert werden konnte. Ihre Ergebnisse unterscheiden sich essentiell von denen der ersten Studie. Die Überexpression von Pax6(5a) führte zu einer vielfach verstärkten Bildung von neuronalen Zellen aus in „embryoid bodies“ differenzierten embryonalen Stammzellen auf morphologischer, mRNA- und Proteinmarkerebene während die Überexpression von „kanonischem“ Pax6 diesen Effekt nicht erzielen konnte. Zusätzlich dazu kann Pax6 mit unterschiedlichen Proteinen interagieren, um seine Funktionen auszuüben. Es bildet beispielsweise einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor Sox2, um anschließend gemeinsam Cristallin-Gene in der Linse des Auges transkriptionell zu aktivieren (Kamachi *et al.*, 2001). Weiterhin aktiviert es im Pankreas zusammen mit Cdx2 oder Maf-Transkriptionsfaktoren den Glucagon-Promotor (Ritz-Laser *et al.*, 1999; Planque *et al.*, 2001). Aktiviert wird Pax6 in der Maus unter anderem durch Notch1 (Meier-Stiegen *et al.*, 2010).

2.6. Der Transkriptionsfaktor *Runx1*

Der Transkriptionsfaktor *Runx1* gehört zur Familie der *core-binding factors* (CBFs), die für ihre Aktivität ihren heterodimeren nicht-DNA-bindenden Partner CBFbeta benötigen (Swiers *et al.*, 2010). Der Knockout von einem dieser Proteine führt zum Tod des Embryos aufgrund von starken Blutungen in bestimmten Teilen des Embryos, unter anderem dem zentralen Nervensystem (Okuda *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Die embryonale Hämatopoese wird in zwei Schritte eingeteilt: die primitive und die definitive Hämatopoese. Die primitive Hämatopoese findet im extraembryonalen Dottersack statt und startet in der Maus an Tag 7,5 post coitus. Es entstehen primitive Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten. Die definitive Hämatopoese findet an unterschiedlichen Orten im Embryo und in extraembryonalen Geweben statt. Es werden Erythrozyten, Zellen aller myeloiden und lymphoiden Linien und hämatopoetische Stammzellen gebildet, die auch im adulten Organismus Ausgangspunkt der Hämatopoese sind (Swiers *et al.*, 2010). Der Knockout von *Runx1* oder CBFbeta resultiert in der vollkommenen Abwesenheit beziehungsweise starken Reduktion von definitiver Hämatopoese (Okuda *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006) während die primitive Hämatopoese nur in Teilen beeinträchtigt ist (Swiers *et al.*, 2010). *Runx1* wird an allen Orten der definitiven Hämatopoese vor der Bildung von definitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Zusätzlich findet sich seine Expression in einigen Endothelzellen und mesenchymalen Zellen (Swiers *et al.*, 2010). Die Expression in Endothelzellen und anschließend in hämatopoetischen Zellen führte zu der These, dass hämatopoetische Vorläuferzellen aus einem endothelialen Vorläufer, dem „hemogenic endothelium“, entstehen (Jaffredo *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 1998) und *Runx1* an diesem Differenzierungsschritt beteiligt ist (Yokomizo *et al.*, 2001; Lacaud *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2005; Hirai *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). Die These des Hämangioblasten beziehungsweise des „hemogenic endothelium“ wurde kürzlich durch verschiedene Veröffentlichungen bestätigt (Zovein *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Eilken *et al.*, 2009; Lancrin *et al.*, 2009; Yoshimoto und Yoder, 2009). Der Notch-Signalweg spielt hier ebenfalls eine Rolle. Er arbeitet in der Hierarchie oberhalb von *Runx1* und induziert seine Expression im Zebrafisch *Danio rerio* (Burns *et al.*, 2005). Zusätzlich dazu ist *Runx1* in der Maus dazu in der Lage, den Defekt in der Hämatopoese, der durch *Notch1*-Deletion verursacht wird, zu kompensieren (Nakagawa *et al.*, 2006). *Runx1* wurde als direktes *Notch1*-Zielgen in mesodermalen Vorläuferzellen identifiziert (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Wie bereits erwähnt (unter 2.1), inhibiert der Notch-Signalweg die Bildung von Flk-1-positiven Zellen. Die fötale Leberkinase Flk-1 wird in frühen Zellen des Seitenplattenmesoderms exprimiert und *Runx1*-Expression reguliert seine Expression, entweder

direkt oder indirekt, herunter (Hirai *et al.*, 2005). Dies führt zu der Vermutung, dass Notch die Bildung von Flk-1-positiven Zellen über die Aktivierung von Runx1 blockiert.

2.7. Fragestellung der Arbeit und Strategie

2.7.1. Fragestellung

Durch den Notch-Signalweg werden sehr vielfältige Funktionen während der embryonalen Entwicklung und im adulten Organismus vermittelt. Auf molekularer Ebene ist vieles über den Signalweg als solches und auch einiges über früh entdeckte Zielgene wie *Hes*- und *Hey*-Gene bekannt. Dennoch gibt es auf der einen Seite viele Effekte von Notch beispielsweise auf verschiedene Zelllinienentscheidungen, deren Mechanismus nicht aufgeklärt ist und auf der anderen Seite bekannte Zielgene von Notch, deren Rolle im Zusammenhang mit Notch nicht geklärt ist. Zu diesen Zielgenen gehören die drei Transkriptionsfaktoren *Sox9*, *Pax6* und *Runx1* (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Alle drei haben, wie der Notch-Signalweg, Funktionen in verschiedenen Geweben während der embryonalen Entwicklung und im adulten Organismus (siehe 2.3, 2.4 und 2.5). Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die bekannten Effekte von Notch1 während der Neurogenese (Abb. 1.5) und während der frühen Hämatopoese im Zusammenhang mit seiner Regulation dieser drei Zielgene stehen. Dazu wurden embryonale Stammzellen verwandt, in die das Tamoxifen-induzierbare NERT-Konstrukt (siehe 2.7.2) stabil transfiziert worden war. Auf diese Art und Weise konnte Notch1 sehr zeitnah konditionell aktiviert werden. Mit Hilfe einer neuralen beziehungsweise mesodermalen Differenzierung sollte das Hauptaugenmerk auf fünf verschiedene Notch1-Effekte gelegt werden:

1. Das Erhalten von neuralen Stammzellen
2. Die Inhibition der Differenzierung in Neuronen
3. Die Förderung der Differenzierung in Gliazellen
4. Die Förderung der Differenzierung in Neuralleistenzellen
5. Die Reduktion der Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung

Dafür musste zuerst eine neurale Differenzierung (Ying *et al.*, 2003) etabliert werden und anschließend die oben genannten Notch1-Effekte untersucht werden. Um dabei den Einfluss der Notch1-Zielgene näher betrachten zu können, sollte die unter 2.7.3 beschriebene siRNA-Strategie angewandt werden. Mit ihr ist es möglich, einzelne Zielgene mittels siRNA herunterzuregulieren und gleichzeitig Notch1 zu aktivieren. So kann die Rolle eines spezifischen Zielgens während eines Notch1-Effektes untersucht werden. *Sox9* ist an der Förderung der Differenzierung in Gliazellen und Neuralleistenzellen beteiligt (siehe 2.3). *Pax6* spielt eine Rolle in der Erhaltung von neuralen Stammzellen und in der Initiation der Differenzierung in Neuronen und *Runx1* konnte mit der Reduktion von Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung

in Verbindung gebracht werden (siehe 2.4 und 2.5). Daher sollte der Einfluss von *Sox9* und *Pax6* auf die Notch1-Effekte während der neuralen Differenzierung und der von *Runx1* während der mesodermalen Differenzierung untersucht werden.

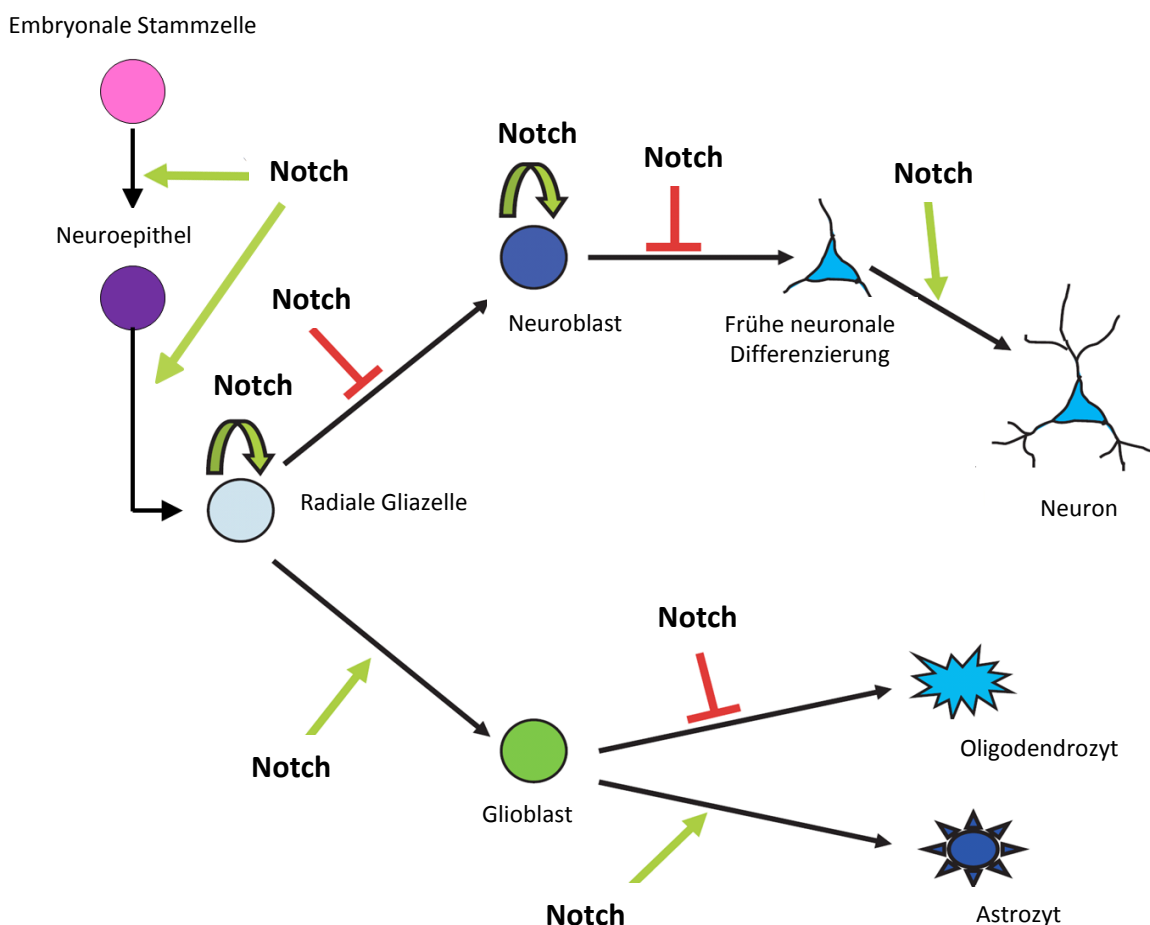


Abbildung 1.5 Notch-Effekte während der neuralen Differenzierung im zentralen Nervensystem Schematische Darstellung der Notch-Effekte während der neuralen Differenzierung im zentralen Nervensystem. Grüne Pfeile: fördernde Wirkung; rote Balken: inhibierende Wirkung; geschwungene Pfeile: erhaltende Wirkung (verändert nach Bolos *et al.*, 2007)

2.7.2. Das NERT-Konstrukt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein konditionell aktivierbares Notch1-Konstrukt verwandt (Schroeder und Just, 2000). Es besteht aus dem intrazellulären Teil des Notch1-Rezeptors ohne die OPA- und PEST-Sequenzen, der an die Hormonbindungsdomäne der Tamoxifen-sensitiven Mutante des humanen Östrogenrezeptors (ERT2) fusioniert ist. Dieses Fusionsprotein (NERT) wird konstitutiv exprimiert und bindet im Cytoplasma an das Hitzeschockprotein 90 (HSP90). Dadurch wird es im Cytoplasma zurückgehalten und kann seine Funktion im Zellkern nicht ausführen. Durch die Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen (OHT), welches an die Hormonbindungsdomäne bindet, wird das NERT-Protein von HSP90 freigesetzt und transloziert

in den Nukleus, wo es seine Zielgene aktivieren kann (Abb. 1.6). Auf diese Art und Weise wird eine sehr schnelle Aktivierbarkeit des intrazellulären Notch1-Rezeptors erreicht, da nicht zuerst, wie bei anderen konditionell aktivierbaren Systemen die Transkription und die Translation des Notch-Rezeptors ablaufen muss. Dieses System ermöglicht es ebenfalls, durch die Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid die Herstellung der mRNA sekundärer Zielgene zu verhindern. Das bedeutet, dass nach Aktivierung des NERT-Konstruktes dieses in den Zellkern transloziert und seine primären Zielgene aktiviert. Diese Erhöhung der mRNA-Menge kann gemessen werden. Da aber bei Verwendung von Cycloheximid keine Proteine hergestellt werden können, werden sekundäre Zielgene, die durch Proteinprodukte der primären Zielgene aktiviert werden würden, nicht induziert. Auf diese Art und Weise ist es möglich, zwischen direkten und indirekten Zielgenen zu unterscheiden.

Das NERT-Protein und der leere Kontrollvektor pCAG-IP wurden stabil in die embryonale Stammzelllinie EB5 transfiziert (Schroeder *et al.*, 2006). Diese Zellen wurden für die Durchführung der Experimente dieser Arbeit verwandt.

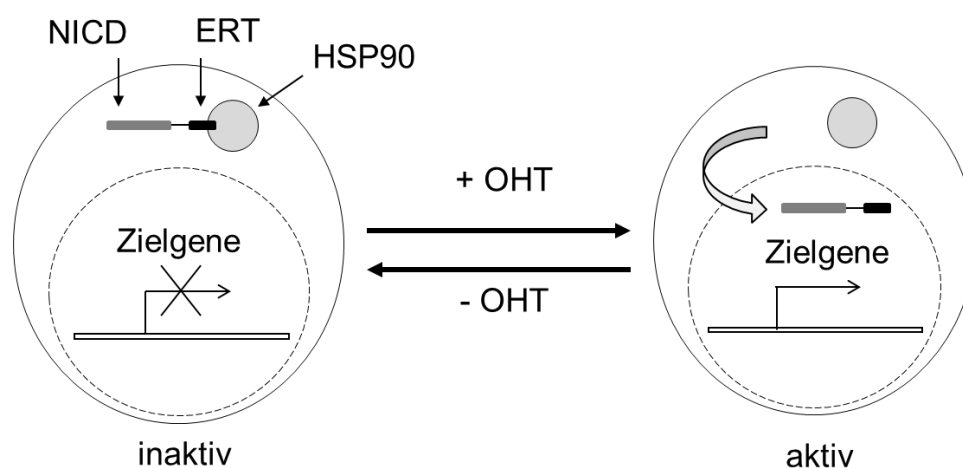


Abbildung 1.6 Das NERT-Konstrukt Schematische Darstellung der Funktionsweise des NERT-Konstruktes. Durch Zugabe von OHT wird das Fusionsprotein vom HSP90 freigesetzt und transloziert in den Zellkern, wo es seine Zielgene aktivieren kann. ERT: Hormonbindungsdomäne der Tamoxifen-sensitiven Mutante des humanen Östrogenrezeptors; HSP: Hitzeschockprotein; NICD: Notch intrazelluläre Domäne; OHT: 4-Hydroxy-Tamoxifen

2.7.3. siRNA-Strategie

Um den Einfluss, den einzelne Zielgene auf die Effekte von Notch1 haben, zu untersuchen, sollte die durch Notch1 hervorgerufene Induktion dieser Zielgene blockiert werden. Gleichzeitig sollten aber alle anderen Zielgene von Notch1 weiterhin aktiviert werden. Um dies zu erreichen, wurde gleichzeitig eine Aktivierung von Notch1 durch die Zugabe von OHT und die Herunterregulierung eines bestimmten Zielgens mit Hilfe spezifischer siRNA durchgeführt. Dabei

sollte die herunterregulierte Expression des Zielgens möglichst das Niveau der Expression ohne Notch1-Aktivierung erreichen (siehe Abbildung 1.7). Dadurch wurde ein vollständiges Ausschalten des Gens, welches zu veränderten, möglicherweise von Notch1 unabhängigen Effekten führen könnte, verhindert. Auf diese Art und Weise konnte der Einfluss, den die Zielgene *Sox9*, *Pax6* und *Runx1* während der neuralen beziehungsweise mesodermalen Differenzierung auf die durch Notch1-induzierten Effekte haben, einzeln untersucht werden.

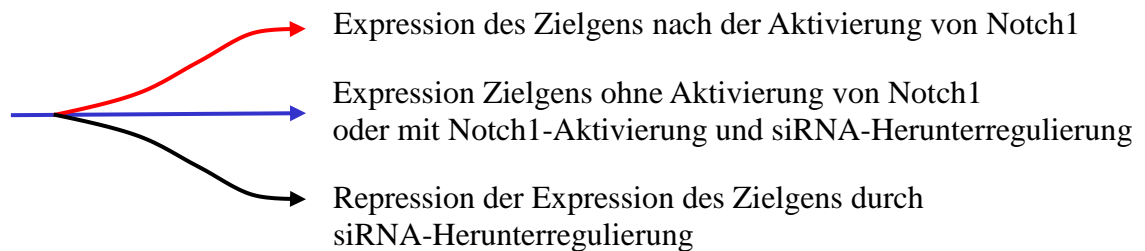


Abbildung 1.7 Die siRNA-Strategie

Schematische Darstellung der siRNA-Strategie: ohne Notch1-Aktivierung befindet sich die Expression eines Zielgens auf einem basalen Niveau (blau). Diese Expression wird durch eine Notch1-Aktivierung erhöht (rot). Durch die Herunterregulierung der Expression des Zielgens durch siRNA ohne Notch1-Aktivierung wird seine basale Expression verringert (schwarz). Durch die gleichzeitige Aktivierung von Notch1 und den Einsatz von siRNA gegen das Zielgen soll das basale Level der Expression ohne Notch1-Aktivierung wieder erreicht werden (blau).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Murine embryonale Stammzelllinien

EB5: embryonale Stammzellen (Subtyp der murinen embryonalen Stammzelllinie E14tg2a), die das Gen für Blasticidinresistenz unter der Kontrolle des *Oct4*-Promotors exprimieren.

Referenz: (Hooper *et al.*, 1987; Niwa *et al.*, 2000)

CCE Runx1-venus: embryonale Stammzellen (hergestellt aus 129/Sv-Mäusen), in die eine modifizierte Form des YFP (yellow fluorescent protein, in diesem Fall venus) in den 5'UTR eines der beiden Runx1-Allele unter der Kontrolle des proximalen Promotors P2 eingefügt wurde.

Referenz: (Keller *et al.*, 1993; Hirai *et al.*, 2005)

3.1.2 Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30%	
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol (β -ME)	SIGMA-Aldrich, München
B27-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
Complete, EDTA-frei (Protease Inhibitor)	Roche, Mannheim
Cycloheximid	SIGMA-Aldrich, München
DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium	Dako, Eching
Diethyldicarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO), zellkulturgetestet	SIGMA-Aldrich, München
DMEM/F12 1:1	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-ladder Fermentas GeneRuler 1kb	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-ladder Fermentas GeneRuler 100bp	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-ladder 50bp	New England BioLabs, Frankfurt
Ethanol (HPLC gradient grade)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fluoroshield Mounting Medium mit DAPI	ImmunoBioScience, Everett, USA
Fötale Kälberserum (FCS), zellkulturgetestet	Lonza, Köln
Gelatine, Type A, zellkulturgetestet	SIGMA-Aldrich, München
Humanes Insulin (4mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Knockout-DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Knockout Serum Replacement (KSR)	Invitrogen, Karlsruhe
Laminin	SIGMA-Aldrich, München
Leukemia inhibitory factor (LIF)	eigene Herstellung
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Fluka, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Neurobasal Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Non Essential Amino Acids 100 x	Invitrogen, Karlsruhe
N2-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldedehyd	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Ornithin hydrobromide	SIGMA-Aldrich, München
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Reactive Brown 10	SIGMA-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA) (98%)	SIGMA-Aldrich, München
RNase-freies Wasser	Dharmacon, Bonn
siRNA-Transfektionsreagenz: DharmaFECT 1	Dharmacon, Bonn
Taqman Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tergitol (Type NP-40)	SIGMA-Aldrich, München
Trichloressigsäure (TCA)	Riedel-de Haën, Seelze
Trypanblaulösung 0,4%	SIGMA-Aldrich, München
Trypsin-EDTA 0,5% (10x) zellkulturgetestet	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
4-Hydroxytamoxifen (OHT)	SIGMA-Aldrich, München
5x siRNA-Puffer	Dharmacon, Bonn
6x Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Roth
10x PBS –MgCl ₂ –CaCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
10x PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Zelldissoziationspuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.3.1 Geräte

Durchflusszytometer FACSCanto	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektronische Einkanalpipette	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Neubauer-Zählkammer	OptikLabor, Friedrichsdorf
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Geldokumentation LAS 3000	Fujifilm, Düsseldorf
Gelkammer für Agarosegele	PeqLab, Erlangen
Gelkammer für SDS-Gelelektrophorese (Mini-Protean 3)	Biorad, München
Inkubator Hera Cell 150	Thermo Scientific, Langenselbold
Kryoboxen	Nalgene, Rochester, USA
Mechanische Einkanalpipetten	Gilson, Offheim
Nanodrop (Spectrophotometer ND1000)	PeqLab, Erlangen
Orbitalmixer, beheizbar Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Jena
Phasenkontrastmikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Pipettierhelfer: accu-jet	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseraufbereitung: MilliQ Plus	Millipore, Schwalbach
Sterilbank HeraSafe	Thermo Scientific, Langenselbold
Waage BL1500S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Langenselbold
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
7900HT Fast Real-TimePCR System	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.3.2 Verbrauchsmaterialien

Cellstrainer	BD Biosciences, Heidelberg
Deckgläschen 13mm	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrierröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen T12,5	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebekulturflaschen T25,T75 roter Deckel	Sarstedt, Nümbrecht

Nitrocellulosemembran 0,45 µm	Whatman, Dassel
Objektträger 76x26 mm	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen 24,5 mm	Nunc, Thermo Scientific, Langenselbold
Pipettenspitzen: mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
QiaShredder-Säulen	Qiagen, Hilden
Reagenz- und Zentrifugenröhre (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
24 well-Platte	TPP, Trasadingen, Schweiz
384well Real-Time-PCR-Platten	Thermo Scientific, Langenselbold
6 well-Platte	Corning, Wiesbaden

3.1.4 Kits

ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
IntraStain	Dako, Eching
Reverse iT 1 st strand synthesis Kit	Abgene, Hamburg
RNeasy Mini Plus	Qiagen, Hilden

3.1.5 Assays für Real-Time-PCR

TaqMan Gene Expression Assay-on-Demand Applied Biosystems, Foster City, USA

Name	Nummer	Amplikon-Größe (bp)
Fgf5	Mm00438919_m1	135
GAPDH	Mm99999915_g1	107
Hes5	Mm00439311_g1	91
Id3	Mm00492575_m1	102
Nestin	Mm00450205_m1	72
Oct4	Mm00658129_gH	148
Pax6	Mm00443072_m1	56
Runx1	Mm00486762_m1	110
Polr2a	Mm00839502_m1	70
Sox9	Mm00448840_m1	101

3.1.6 Primer

Name		Sequenz	Amplikon-Größe (bp)
T (Brachyury)	for	CATGCTGCCTGTGAGTCATAACG	173
	rev	GCGTCAGTGGTGTGTAATGTGC	
Foxd3	for	ATCTGCGAGTTCATCAGCAACC	108
	rev	GATCTTGACGAAGCAGTCGTTG	
GFAP	for	ACTCAACGTAAAGCTAGCCCTG	110
	rev	TCTGGAGGTTGGAGAAAGTCTG	
HPRT	for	GCAGTACAGCCCCAAAATGG	85
	rev	AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA	
Snai1	for	TCTGAAGATGCACATCCGAAGC	128
	rev	AGCAGGAGAATGGCTTCTCACC	
Snai2	for	CCACACATTGCCTTGTGTCTGC	159
	rev	TGCAGATGTGCCCTCAGGTTTG	
Sox2	for	TTCTAGTGGTACGTTAGGCGCTTC	213
	rev	AAACCCAGCAAGAACCCTTTCC	
Sox17	for	TCCAGAACTGCAGACCAGAAGC	135
	rev	TGGAGGTGCTGCTCATTGTATCC	
Tubb3 1	for	GGAGCTGTTCAAACGCATCTCG	132
	rev	ACCAGGTCATTATGTTGCTCTCG	
Zic5	for	ATCCACAAGCGCACTCATACAG	87
	rev	TCGATCGCTGCTATTGGCAAAC	

3.1.7 Puffer, Lösungen und Zellkultur-Medien

Proteinlysispuffer

1%	SDS
10 mM	EDTA
50 mM	Tris/HCl pH 7,5

Proteinladepuffer (4x)

4%	SDS
16%	Glycerin
25 mM	Tris/HCl, pH 6.8
0.01%	Bromphenolblau

Einfriermedium EB5

50%	FCS
40%	ErhaltungsmEDIUM EB5 oder CCE
10%	DMSO

Mesodermales Differenzierungsmedium	ad 100	alpha-MEM
	15%	FCS für mesodermale Differenzierung
	2mM	L-Glutamin
	0,1 mM	β-Mercaptoethanol
Neurales Differenzierungsmedium N2B27	50%	Neurobasal
	50%	DMEM/F12 + Glutamax
	1%	B27 Supplement
	0,5%	N2-Supplement
	0,5%	L-Glutamin
	37,5 µg/ml	BSA
	12,5 µl/ml	Insulin
	0,1 mM	β-Mercaptoethanol
Erhaltungsmedium EB5	ad 100	KO-DMEM
	10%	KSR
	1%	FCS
	2 mM	L-Glutamin
	1%	Non Essential Amino Acids
	10 ng/ml	LIF
	0,1 mM	β-Mercaptoethanol
Erhaltungsmedium CCE	ad 100	KO-DMEM
	15%	FCS
	2 mM	L-Glutamin
	1%	Non Essential Amino Acids
	10 ng/ml	LIF
	0,1 mM	β-Mercaptoethanol
FACS-flow Puffer	2,74 M	NaCl
	0,05 M	KCl
	0,16 M	Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O
	0,04 M	KH ₂ PO ₄
	0,03 M	Natriumazid

TAE-Puffer (50x)	2 M	Tris/HCl
	1 M	Natriumacetat
	62,5 mM	EDTA
	pH 8,5	
Blotting-Puffer (1x)	1 x SDS-Laufpuffer	
	20%	Methanol
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM	Tris/HCl
	1,92 M	Glycin
	1%	SDS
FACS-Waschpuffer	PBS –CaCl ₂ –MgCl ₂	
	0,1%	Natriumazid
	5%	FCS
PBST		PBS
	0,1%	Tween20
Stripping-Lösung	140 µl	β-Mercaptoethanol
	1,25 ml	1M Tris/HCl pH 6,7
	4 ml	10% SDS
	ad 20 ml	H ₂ O

3.1.8 Antikörper

3.1.8.1 Primäre Antikörper

Kaninchen anti-Maus Actin-(I-19)-R	Santa Cruz, Heidelberg
Kaninchen anti-Maus GFAP Z0334 polyklonal	Dako, Eching
Kaninchen anti-Maus Pax6 PRB-278P polyklonal	Covance, München
Kaninchen anti-Maus Sox9	Geschenk von Prof. Dr. Michael Wegner, Erlangen Nürnberg (Stolt <i>et al.</i> , 2003)
Maus anti-Maus GFAP G3893 IgG1	SIGMA-Aldrich, München
Maus anti-Maus Nestin Alexa647 560393 IgG1	Becton Dickinson, Heidelberg

Maus anti-Maus Sox2 FITC FCMAB112F IgG2b	Millipore, Schwalbach
Maus anti-Maus TuJ1 Alexa488 A488-435L IgG2a	Covance, München
Ratte anti-Maus Flk-1 APC 560070 Avas 12 α 1 IgG2a	Becton Dickinson, Heidelberg

3.1.8.2 Sekundäre Antikörper

Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa488 polyklonal	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase	Jackson ImmunoResearch Newmarket, UK
Ziege anti-Maus IgG und IgM Cy3 polyklonal	Chemicon, Millipore, Schwalbach

3.1.8.3 Isotyp-Kontrollen

Kaninchen IgG	Geschenk von Dr. Claudia Lange, Hamburg
Maus IgG1, k Alexa647	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus IgG2a, k FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus IgG2b FITC	eBioscience, San Diego, USA

3.1.9 siRNA

OnTarget PLUS Non-targeting pool	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse GAPDH pool	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse Sox9 smart pool	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse Sox9-10	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse Pax6 smart pool	Dharmacon, Bonn
OnTarget PLUS mouse Pax6-08	Dharmacon, Bonn

3.1.10 Software

Adobe Photoshop Version 6.0	Adobe Systems, München
FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg
Microsoft Excel	Microsoft, Unterschleißheim
SDS 2.2.2 (7900HT, Version 2.2.2)	Applied Biosystems, Foster
AxioVision LE Rel. 4.7	Zeiss, Jena
ND1000 3.5.2	PeqLab, Erlangen
CorelDraw 11	Corel, Ottawa, Kanada
Soft Imaging System cell-B	Olympus, Hamburg

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturmethoden

3.2.1.1 Kultur undifferenzierter embryonaler Stammzellen

Zur Beschichtung wurden 4 bzw. 10 ml (T25 bzw. T75) 0,1% Gelatine in Gewebekulturflaschen gegeben und ca. 30 Minuten lang inkubiert. Die undifferenzierten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurden alle zwei Tage mit Trypsin abgelöst, zum Abstoppen des Trypsins in frisches Erhaltungsmedium gegeben und 5 Minuten bei 1000 rpm, RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem Erhaltungsmedium versetzt, die Zellen resuspendiert und in einer neuen, mit Gelatine beschichteten Gewebekulturflasche verdünnt ausgesät. Dafür wurde die Gelatine kurz vor dem Aussäen abgesaugt. Üblicherweise wurden die Zellen auf diese Weise 1:3 bis 1:8 gesplittet, sodass eine Zellzahl von ca. $5-7 \times 10^5$ pro T25-Flasche erreicht wurde. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre inkubiert.

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von embryonalen Stammzellen

In Kultur befindliche ES-Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und in Einfriermedium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Einfrierröhrchen verteilt, die anschließend in eine mit Isopropanol gefüllte Kryobox gestellt wurden. Die Kryobox wurde umgehend in einer -80°C-Truhe gelagert um die Proben durch die Kryobox langsam (ca. 1°C pro Minute) auf -80°C herunter zu kühlen. Anschließend wurden sie für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Üblicherweise wurden ca. 1×10^6 Zellen in ein Einfrierröhrchen gegeben.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, die Zellsuspension durch Schwenken im 37°C Wasserbad angetaut, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und dann tropfenweise mit kaltem 5 ml Erhaltungsmedium versetzt. Um das toxische DMSO, das im Einfriermedium enthalten ist, zu entfernen, wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischen 5ml Erhaltungsmedium aufgenommen und in eine zuvor mit Gelatine beschichtete T25-Gewebekulturflasche gegeben.

3.2.1.3 Neurale Differenzierung von embryonalen Stammzellen

Die neurale Differenzierung wurde nach Ying *et al.* 2003 durchgeführt. Es handelt sich um eine Monolayer-Differenzierung in N2B27-Medium. Dazu wurden die EB5-Nert Zellen einen Tag nach dem Splitten mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und in N2B27-Medium aufgenommen. Sie wurden gezählt und in einer Zellzahl zwischen 0,125 und 1×10^5 Zellen pro well in 6well-Platten von Corning ausgesät. Dabei enthielt jedes well 2 ml Medium. Anschließend wurde alle ein bis zwei Tage das Medium gewechselt. Der Differenzierungszeitraum lag zwischen einem und

16 Tagen. Zur Notch1-Aktivierung wurden 5, 50 oder 500 nM OHT zusammen mit dem Medium und bei jedem Mediumwechsel neu zugegeben.

3.2.1.4 Mesodermale Differenzierung von embryonalen Stammzellen

Die mesodermale Differenzierung wurde mit Hilfe sogenannter *embryoid bodies* in hängenden Tropfen durchgeführt. Dazu wurden embryonale Stammzellen durch Trypsin von der Oberfläche abgelöst, zentrifugiert und in mesodermalem Differenzierungsmedium aufgenommen. Sie wurden gezählt und auf eine Zellzahl von 4×10^4 /ml eingestellt. Anschließend wurden 5 ml steriles Wasser in bakteriologische Petrischalen gegeben und die Zellsuspension auf die Innenseite des Deckels getropft. Dabei bestand jeder Tropfen aus 20 µl Flüssigkeit und es wurden je 50 Tropfen auf einem Deckel verteilt. Der Deckel wurde mit den Tropfen nach unten auf die Petrischale gelegt und für ein bis zwei Tage im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit sammelten sich die Zellen in den Spitzen der Tropfen und bildeten runde Zellaggregate, die *embryoid bodies*. Nach ein bis zwei Tagen wurden die *embryoid bodies* mit 10 ml frischem mesodermalem Differenzierungsmedium vom Deckel in eine frische, leere Petrischale gespült und hier weitere drei bis acht Tage inkubiert, wobei sie auf der Schale adhärten. Es wurden die *embryoid bodies* von je drei Deckeln in einer neuen Petrischale vereint. Das Medium wurde an Tag 5 und an Tag 7 der Differenzierung erneuert. Zur Notch1-Aktivierung wurden 500 nM OHT zusammen mit dem Medium und bei jedem Mediumwechsel neu zugegeben.

3.2.1.5 Mycoplasmen-PCR

Um Mycoplasmen-Kontaminationen auszuschließen, wurden die Zellen regelmäßig durch eine PCR auf das Vorhandensein von Mycoplasmen-DNA getestet. Diese PCR war eine sogenannte „nested PCR“ in der zwei PCR-Runden hintereinander mit verschiedenen Primern durchgeführt wurden. Alle eingesetzten Zellen waren mycoplasmenfrei. Die eingesetzten Primer waren:

```
*: Sequenzen der äußeren Primer ( 5'- u. 3'-Gemisch):
5'-Primer-Mix: CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC
                CGCCTGAGTAGTACGTACGC
                TGCCTGAGTAGTACATTCCG
                CGCCTGGGTAGTACATTTCGC
                CGCCTGAGTAGTATGCTCGC
                TGCCTGGGTAGTACATTTCGC

3'-Primer-Mix: GCGGTGTGTACAAGACCCGA
                GCGGTGTGTACAAAACCCGA
                GCGGTGTGTACAAACCCGA

■ Primergemisch MIP** (innerer Primer = 2. PCR-Runde)
**: Sequenzen der inneren Primer ( 5'- u. 3'-Gemisch):
5'-Primer -Mix: TGGTGCATGGTTGTCGTCAG
                TGGTGACGGTTGTCGTCAG

3'-Primer-Mix: GAACGTATTCACCGCAGCATA
                GAACGTATTCACCGCGACATA
                GAACGTATTCACCGTAGCGTA
                GAACGTATTCACCGCAGCGTA
                GAACGTATTCACCGCAGTATA
                GAACGTATTCACCGCAACATG
                GAACGTATTCACCGCGACATG
```

Produktlänge der ersten PCR: 520bp, Produktlänge der zweiten PCR: 300bp

3.2.1.6 Intrazelluläre FACS-Analyse

Die intrazelluläre FACS-Analyse wurde mit Hilfe des IntraStain-Kits von DAKO nach den Angaben des Herstellers mit kleinen Änderungen durchgeführt. Änderungen waren folgende:

1. Das Kit war auf Färbungen mit einem fluorochromkonjugierten Primärantikörper ausgelegt. Da nicht alle verwendeten Primärantikörper direkt fluoreszenzmarkiert waren, wurde in solchen Fällen ein zweiter Färbeschritt durchgeführt: nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde ein Waschschriff durchgeführt, anschließend 50 µl Lösung B und der sekundäre Antikörper zugegeben und für 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschriff.
2. Anstatt 100 µl Lösung A zu 50µl Zellsuspension zu geben, wurden nur 50 µl Lösung A zu 50 µl Zellsuspension gegeben.
3. Es wurde mit dem FACS-Waschpuffer gewaschen.
4. Nach dem Aspirieren wurden ca. 10 µl anstatt 50 µl Überstand übriggelassen.

5. Es wurden pro Röhrchen lediglich 50 µl Lösung B gegeben. Lösung B war zusätzlich 1 µl NP40/ml zugesetzt worden, um eine Permeabilisierung des Zellkerns sicherzustellen.
6. Vor dem ersten Färbeschritt wurde 20 Minuten geblockt. Blockreagenz war Lösung B mit 3% Ziegenserum. Danach folgte kein Waschschrift. Der Primärantikörper wurde direkt in die Blocklösung pipettiert.
7. Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper bei 4°C und nicht bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert.

Die Proben wurden anschließend durch Gaze-Stoff gefiltert und in einem FACSCanto (Becton Dickinson) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FACSDiva-Software von Becton Dickinson.

3.2.1.7 Extrazelluläre FACS-Analyse

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Zelldissoziationspuffer abgelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden 50 µl 5% FCS/PBS und 0,5 µl Fc-Block zum Blocken unspezifischer Bindestellen zugegeben, 5 Minuten inkubiert und zu jeder zu färbenden Probe 1 µl APC-konjugierter Flk-1-Antikörper gegeben. Die Zellen wurden 60 Minuten bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 500 µl 2% FCS/PBS aufgenommen, durch *cell-strainer* gefiltert und in einem FACSCanto (Becton Dickinson) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FACSDiva-Software von Becton Dickinson.

3.2.1.8 siRNA-Transfektion

Die lyophilisierte siRNA wurde nach Angaben des Herstellers resuspendiert (Dharmacon, „*Basic siRNA Resuspension*“) und nach einer Konzentrationsmessung im Photometer aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Transfektion der EB5-Nert Zellen erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers (Dharmacon, „*DharmaFECT General Transfection Protocol*“) mit dem Transfektionsreagenz DharmaFECT I. Die Zellen wurden durch Trypsin abgelöst, abzentrifugiert, gezählt und in Erhaltungsmedium in 6well-Platten ausgesät. 6-8 Stunden später wurde die Transfektion vorgenommen, das Medium zu N2B27 gewechselt und Notch durch Zugabe von OHT aktiviert. Pro well wurden 4 µl DharmaFECT I zugegeben. Um zu kontrollieren ob ein Herunterregulieren der spezifischen mRNA durch die transfizierte siRNA erreicht werden konnte, wurde nach 24 Stunden RNA geerntet und eine Real-Time PCR durchgeführt. Für die siRNA gegen Sox9 wurde eine Endkonzentration von 100 nM, für die siRNA gegen Pax6 eine Endkonzentration von 50 nM eingesetzt. Als Kontrolle diente immer das Transfektionsreagenz ohne siRNA.

3.2.2 RNA-Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolierung

Die Zellen wurden entweder direkt in der Gewebekulturflasche oder in 6well-Platten durch Zugabe des *RLT*-Puffers aus dem *RNeasy Mini Plus* Kit von Qiagen lysiert oder zuerst durch Trypsin abgelöst, zentrifugiert und dann in *RLT*-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben im *RLT*-Puffer bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolierung wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *RNeasy Mini Plus* Kit von Qiagen durchgeführt. Eluiert wurde mit 30-50 µl RNasefreien Wassers.

3.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte im Photometer (Nanodrop) mit RNasefreiem Wasser als Referenz. Die Absorption der Probe wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Das Verhältnis E_{260}/E_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der Probe. Es sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration der Probe wurde mithilfe der Absorption bei 260 nm ermittelt:

$$c \text{ (ng/}\mu\text{l)} = E_{260} \times 40$$

3.2.2.3 Agarosegel

Um eine mögliche Degradierung der RNA auszuschließen, wurden die Proben in einem 1% TAE-Agarosegel überprüft. Es wurden zwischen 0,1 und 1 µg RNA mit Ladepuffer vermischt aufgetragen und 30-45 Minuten bei 100V aufgetrennt. Die Anfärbung der Nukleinsäuren erfolgte dabei durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid. Bei intakter RNA wurden zwei Banden, die die 28s und 18s rRNA darstellen im Verhältnis 2:1 sichtbar.

3.2.2.4 RNA-Fällung

Für die Langzeitlagerung von RNA wurden die Proben gefällt, um ihre Haltbarkeit zu verlängern. Dazu wurden den RNA-Proben im Verhältnis 1: 2,5 mit 100% Ethanol und im Verhältnis 1:0,1 mit 3M Natriumacetat versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des *Reverse iT 1st strand Synthesis* Kit von Abgene beziehungsweise des *First Strand cDNA Synthesis Kit* von Fermentas nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Üblicherweise wurden 0,5 µg oder 1 µg RNA eingesetzt. Es wurden stets Oligo(dT)₁₈-Primer verwandt und die Reaktion bei 37°C für 60 Minuten durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.4 *Real-Time* PCR

Zur Quantifizierung der mRNA wurde eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Dazu wurden entweder TaqMan-Sonden (*TaqMan Gene Expression Assay-on-Demand*) oder SYBR-Green Detektion (*Power SYBR-Green*) von Applied Biosystems verwandt.

Der Reaktionsansatz war folgender:

4,5 µl	MilliQ-H ₂ O
4,5 µl	Mastermix (entweder <i>TaqMan Universal PCR MasterMix</i> oder <i>Power SYBR® Green PCR Master Mix</i>)
0,5 µl	cDNA
0,5 µl	Primer-Mix (entweder <i>TaqMan Gene Expression Assay-on-Demand</i> oder selbsthergestellter Primer-Mix in H ₂ O (6µM))

Die PCR wurde in einer 384well-Platte mit dem Gerät *Real-Time PCR System 7900HT* durchgeführt. Die Proben wurden als Duplikate gemessen. Folgende Programme wurden verwandt:

Für PCR mit TaqMan-Sonden:

Schritt 1	95°C	15 min
Schritt 2	95°C	15 sek
Schritt 3	60°C	1 min

Schritt 2 und 3 wurden 40 Mal wiederholt.

Für PCR mit SYBR-Green:

Schritt 1	95°C	10 min
Schritt 2	95°C	15 sek
Schritt 3	60°C	15 sek
Schritt 4	72°C	30 sek
Schritt 5	75°C	30 sek

Schritt 2, 3, 4 und 5 wurden 40 Mal wiederholt.

Bevor ein TaqMan-Assay für eine *Real-Time* PCR eingesetzt wurde, wurde eine Standardkurve mit Hilfe einer cDNA-Konzentrationsreihe erstellt, um seine Effizienz zu ermitteln.

Die für die PCR mit SYBR-Green eingesetzten Primer-Mischungen, wurden zuerst einer Standard-PCR mit demselben Programm, das später für die *Real-Time* PCR verwandt wurde, unterzogen. Anschließend fand eine Überprüfung der PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel statt. Abschließend wurde, wie für die TaqMan-Assays, eine Standardkurve erstellt und die Effizienz eines Primerpaares ermittelt.

Die Auswertung erfolgte mit der Software *SDS 2.2.2* (7900HT, Version 2.2.2) und *Microsoft Excel*. Alle Werte wurden auf ein konstitutiv exprimiertes Gen (*GAPDH*, *HPRT* oder *RNA-Polymerase 2 Peptid a*) normalisiert.

3.2.5 Protein-Methoden

3.2.5.1 Proteinisolierung

Die EB5-Nert Zellen wurden durch Trypsin abgelöst, zentrifugiert und in Proteinlysispuffer (versetzt mit *Complete Proteaseinhibitor*) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben zur Reduktion der Viskosität durch chromosomale DNA sonifiziert und bei -20°C gelagert.

3.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Proteinproben wurde mit dem Photometer bestimmt. Es wurden die Absorptionen bei 230 nm, 235 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Anschließend wurde mit Hilfe folgender Formeln die Konzentration der Proteinprobe ermittelt. Die Formeln stellen drei unterschiedliche photometrische Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung dar (Waddell, 1965; Whitaker und Granum, 1980).

$$(1.55 \times E_{280} - 0.76 \times E_{260}) = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$((E_{235} - E_{280}) / 2.51) = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$(0.183 \times E_{230} - 0.0758 \times E_{260}) = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Hieraus wiederum wurde der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde zur Kontrolle ein „Dot Blot“ durchgeführt: die Proben wurden durch Zugabe von MilliQ-H₂O so verdünnt, dass für jede Probe die gleiche Konzentration erreicht wurde. Diese Verdünnungen wurden auf eine Nitrocellulosemembran getropft, mit 0,05% *Reactive Brown*-Lösung (Yonan *et al.*, 2005) angefärbt, getrocknet und per Augenmaß miteinander verglichen.

Alternativ dazu wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Roti-Quant-Universal-Lösung bestimmt. Dabei wurde die Standardkurve mit Proben bekannter Konzentration von BSA hergestellt.

3.2.5.3 Trichloressigsäure-Fällung

Bei sehr geringer Proteinkonzentration wurden die Proben mittels einer Trichloressigsäurefällung aufkonzentriert. Dazu wurden sie mit dem halben Volumen 100%iger Trichloressigsäure gemischt, eine Stunde auf Eis inkubiert, bei ca. 13000 rpm 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es schlossen sich zwei Waschschrte, einmal mit saurem Aceton (0,2% HCl, -20°C) und einmal mit Aceton (-20°C), an. Das Pellet wurde getrocknet und in Proteinlysispuffer resuspendiert.

3.2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt.

Das Gel setzte sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen:

Trenngel (12%):

30% Acrylamid(Bisacrylamid)	4 ml
1,5M Tris pH 8,8	2,5 ml
10% APS	0,1 ml
10% SDS	0,1 ml
Temed	4 µl
H ₂ O	3,3 ml

Sammelgel

30% Acrylamid/Bisacrylamid)	0,85 ml
1M Tris pH 6,8	0,625 ml
10% APS	0,05 ml
10% SDS	0,05 ml
Temed	5 µl
H ₂ O	3,4 ml

Bevor die Proteine auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit Protein-Ladepuffer (inklusive 6% β -Mercaptoethanol) versetzt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um sie zu denaturieren. Anschließend wurden 25-30 µl auf das Gel aufgetragen und die Proteine 10-15 Minuten bei 100 Volt und dann eine Stunde bei 180 Volt aufgetrennt.

3.2.5.5 Western Blot

Um die Proteine von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren, wurde ein Western Blot nach der *Tank-Blot*-Methode durchgeführt. Dabei wurden Gel und Membran aufeinandergelegt und dann zwischen je zwei Whatman-Papieren und einem Schwamm in der dafür vorgesehenen Halterung befestigt. Diese Kassette wurde komplett in Blotting-Puffer versenkt. Für eine Stunde wurde bei 4°C ein konstanter Strom von 350 mA so angelegt, dass die Anode auf der Seite der Membran lag. Um den erfolgreichen Transfer nachzuweisen, wurde die Membran kurz mit Ponceau S inkubiert, das mit Wasser wieder ausgewaschen wurde. Anschließend erfolgte der Nachweis der Proteine durch die Bindung spezifischer Antikörper. Dafür wurden zunächst unspezifische Bindestellen auf der Membran durch 5% BSA/ Phenolrot/ 0,01% Natriumazid/ TBS über Nacht bei 4°C geblockt. Anschließend

wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper in der Blocklösung inkubiert, 4 Mal mit PBST gewaschen, eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden zweiten peroxidasekonjugierten Antikörper in 2% ECL-Blockingreagenz inkubiert und wieder 4 Mal mit PBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des *ECL advanced* Kits in dem Geldokumentationsgerät LAS 3000.

3.2.5.6 „Strippen“ einer Nitrocellulosemembran

Um die Western Blot Membranen für weitere Proteindetektionen wieder zu verwenden, wurden die Antikörper von der Membran wieder abgelöst, indem sie in Stripping-Lösung für 30 Minuten bei 50°C im Wasserbad geschwenkt und anschließend 4 Mal mit PBST gewaschen wurden. Nach einem Blockschrift (wie unter 3.2.7.5) konnte sie erneut für eine Proteindetektion mit Antikörpern verwandt werden.

3.2.5.7 Immunfluoreszenzfärbung

13 mm Deckgläschen, die zuvor in 24well-Platten platziert worden waren, wurden über Nacht bei 37°C mit 15 µg/ml Poly-L-Ornithin inkubiert, drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5µg/ml Laminin für zwei Stunden bei 37°C beschichtet. Bevor die EB5-Nert Zellen darauf ausgesät wurden, fand erneut ein dreimaliger Waschschrift mit PBS statt. Die Zellen wurden in N2B27-Medium in einer Dichte zwischen 3000 und 8000 Zellen pro well ausgesät und nach 7-16 Tagen gefärbt. Alle ein bis zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Zur Notch-Aktivierung wurden 50 nM OHT zusammen mit dem Medium zugegeben.

Für die Färbung wurde nach einem Waschschrift mit PBS eine 20minütige Fixierung auf Eis mit 4% Formaldehyd in PBS durchgeführt, 2 Mal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindestellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit PBS/ 3% Ziegenserum/ 0,1% TritonX-100 geblockt. Bei Verwendung des Sox9-Antikörpers von Prof. Dr. Michael Wegner (Erlangen, Nürnberg) wurde mit PBS/ 10% FCS/ 1% BSA/3% Ziegenserum/ 0,1% TritonX-100 geblockt. Da in diesem Block-Reagenz bereits TritonX-100 enthalten war, wurde so gleichzeitig eine Permeabilisierung der Zellmembran und des Nukleus erreicht. Daran schloss sich die Färbung mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C an. Dafür wurden 50 µl Antikörper (verdünnt im jeweiligen Block-Reagenz) auf Parafilm getropft und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf dem Tropfen platziert. Der bestückte Parafilm wurde auf nassem Zellstoffpapier in einer geschlossenen, mit Aluminiumfolie umhüllten großen Petrischale inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS fand die Färbung mit dem sekundären Antikörper auf die gleiche Weise wie mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur statt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden ca. 20 µl des *Fluoroshield Mounting*

Mediums (enthielt DAPI) auf einen Objektträger gegeben und der Deckgläschen mit der Zellseite nach unten im Mounting Medium platziert. Alternativ wurde die Zellen nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 10 Minuten in 0,3 µg/ml DAPI inkubiert, drei Mal gewaschen und in *Fluorescent Mounting Medium* (ohne DAPI) eingebettet. Die gefärbten Deckgläschen wurden mit einem Axiovert 200 M Mikroskop analysiert und die Aufnahmen anschließend mit der *AxioVision LE* (Zeiss, Jena), *Adobe Photoshop* (Adobe Systems, München) und *CorelDraw* (Corel, Ottawa, Kanada) – Software ausgewertet.

3.2.6 Statistische Methoden

Um die statistische Signifikanz der erhaltenen Werte zu ermitteln, wurde der Student's t-Tests für gepaarte oder heteroskedastische Daten angewandt. Für die Analyse von *Real-Time* PCR-Daten wurden die Delta-Ct-Werte als Grundlage der Berechnung verwandt, für FACS-Daten wurde die statistische Relevanz aus den Induktionswerten berechnet.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von Notch1 auf die neurale Differenzierung

Es ist bekannt, dass Notch die Differenzierung in Neuronen inhibiert, neurale Stammzellen in ihrem Vorläuferstadium erhält und die Differenzierung in Gliazellen fördert (Lowell *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007; Cau und Blader, 2009; Namihira *et al.*, 2009) (siehe 2.3). Außerdem fördert Notch die Differenzierung in Neuralleistenzellen (Morrison *et al.*, 2000; Endo *et al.*, 2002; Glavic *et al.*, 2004) (siehe 2.3). Um die Effekte von Notch1 und seinen beiden Zielgenen *Sox9* und *Pax6* *in vitro* untersuchen zu können, wurden embryonale Stammzellen mit Hilfe eines neuronalen Differenzierungsmediums (siehe 3.2.3.3) differenziert. Da diese Zellen das NERT-Konstrukt enthielten (siehe 2.6.2), war es möglich, Notch1 durch Zugabe von OHT zu aktivieren. In diesem Abschnitt werden zuerst die Effekte, die die Aktivierung von Notch1 durch OHT auf die neurale Differenzierung *in vitro* hat, untersucht. Dazu werden die Morphologie der differenzierenden Zellen, die RNA-Profile von für die neurale Differenzierung wichtigen Markern und die Anzahl der für einige dieser Marker positiven Zellen analysiert. Dafür wurden Phasenkontrastmikroskopaufnahmen, Real-Time PCR Analysen, FACS-Experimente und Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt. In anschließenden Kapiteln wurde der Einfluss von *Pax6* und *Sox9* auf die durch Notch1 induzierten Effekte näher betrachtet.

4.1.1 Einfluss von Notch1 auf die Zellmorphologie während der neuronalen Differenzierung

Zuerst wurde die Morphologie der Zellen während der neuronalen Differenzierung mit beziehungsweise ohne konstante Zugabe von 50 nM OHT untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops an verschiedenen Tagen der Differenzierung fotografiert. Abbildung 4.1 zeigt den Verlauf der Differenzierung ohne Notch1-Aktivierung durch OHT. Nach dem Aussäen bildeten Einzelzellen Kolonien, von denen ausgehend sich typische neurale Strukturen entwickelten. Ab Tag 4 bis 6 waren erste Rosetten zu erkennen. Diese bestehen aus neuronalen Stammzellen, die vom Rand der Rosetten ausgehend differenzieren. Am Rand der Rosetten bildeten sich ab Tag 8 erste Axone, die die Kolonien miteinander verbanden. Diese vorerst einzelnen Axone entwickelten sich an späteren Zeitpunkten zu dann dicken Axonbündeln. In jeder der beobachteten Differenzierungsansätze ließen sich zusätzlich zu neuronalen Zelltypen Zellen beobachten, die Epidermiszellen ähnelten, bisher aber nicht näher untersucht wurden. In einigen Kulturen wurden ringförmige Strukturen nachgewiesen, die Ähnlichkeit mit einer zweidimensionalen Nachbildung eines Neuralrohrs aufwiesen. Während der gesamten Differenzierung waren tote Zellen in den Kulturen vorhanden. Vor allem zwischen Tag 4 und Tag 10 musste das Medium jeden Tag gewechselt werden, da etwa die Hälfte der Zellen tot waren. Es

liegt daher die Vermutung nahe, dass dieses neurale Differenzierungsmedium das Überleben bestimmter Zellpopulationen inhibiert.

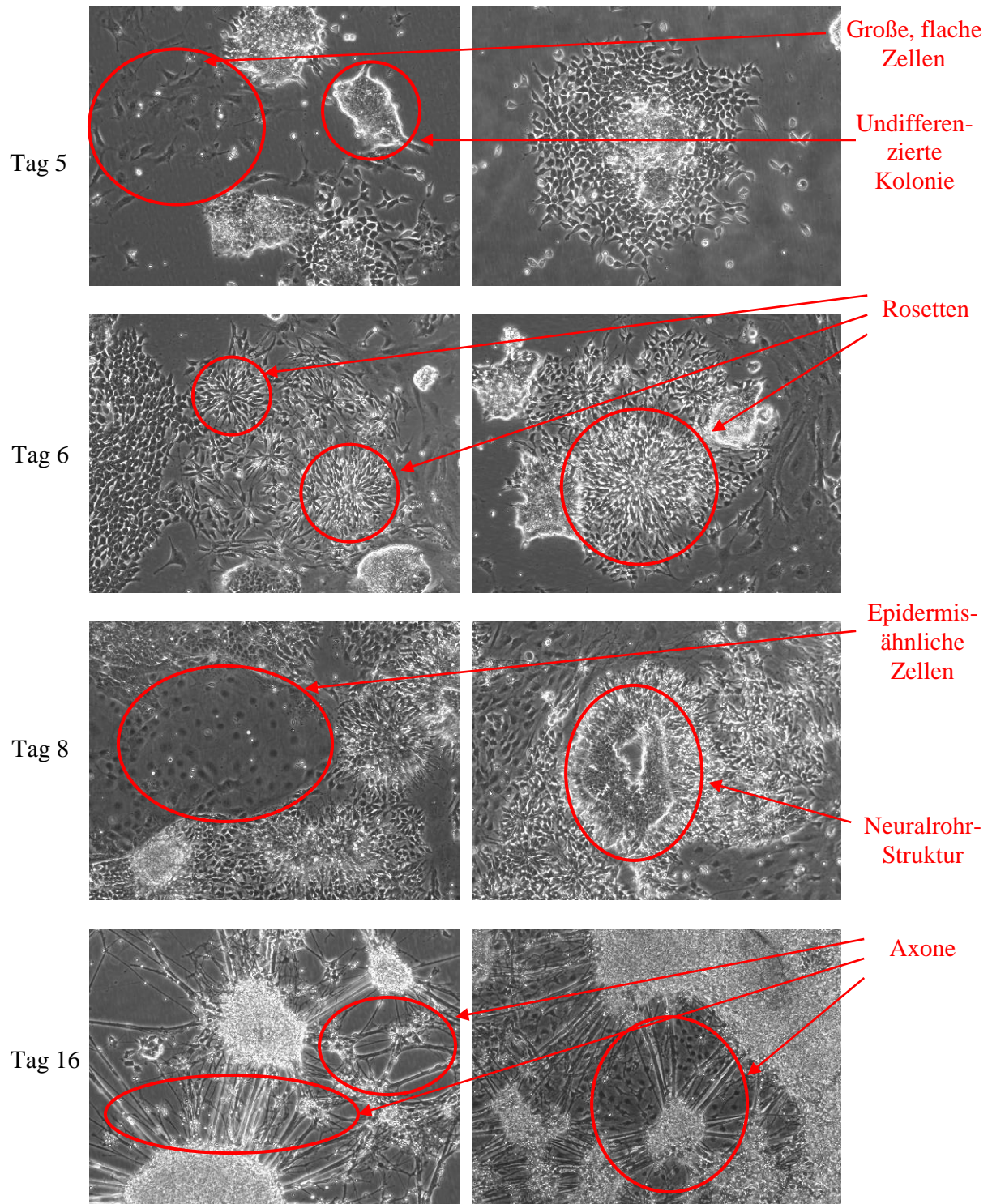


Abbildung 4.1 Morphologischer Verlauf der neuralen Differenzierung ohne Notch1-Aktivierung durch Zugabe von OHT EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und während der Differenzierung mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops unter Verwendung eines 10-fachen Objektives fotografiert.

Die konstante Zugabe von 50 nM OHT resultierte in einer kompletten Veränderung der Morphologie von Beginn der Differenzierung an (Abbildung 4.2). Die Zellen wiesen eine sehr viel größere und flachere Form auf. Die Kolonien waren weniger kompakt und die Zellen schienen sich leicht von ihnen zu lösen und über die gesamte Fläche zu verteilen, was auf eine höhere Migrationsrate schließen lässt. Mitten in diesen großen, flachen Zellen bildeten sich „neuronal Cluster“ mit morphologisch komplett anders gestalteten Zellen. Es handelte sich um bipolare Zellen und um kleine Rosetten, die in späteren Differenzierungsstadien dünne Fortsätze ausbildeten und somit morphologisch neuronalen Stammzellen oder frühen neuronalen Stadien ähnelten. Die großen, flachen Zellen, die etwa 80-90 % der Population stellten, wurden zwischen Tag 7 und Tag 8 konfluent. Ihre Form konnte anschließend nur noch schwer identifiziert werden, da sie sehr eng gedrängt wuchsen. Insgesamt konnten bei der Differenzierung mit OHT weniger tote Zellen beobachtet werden.

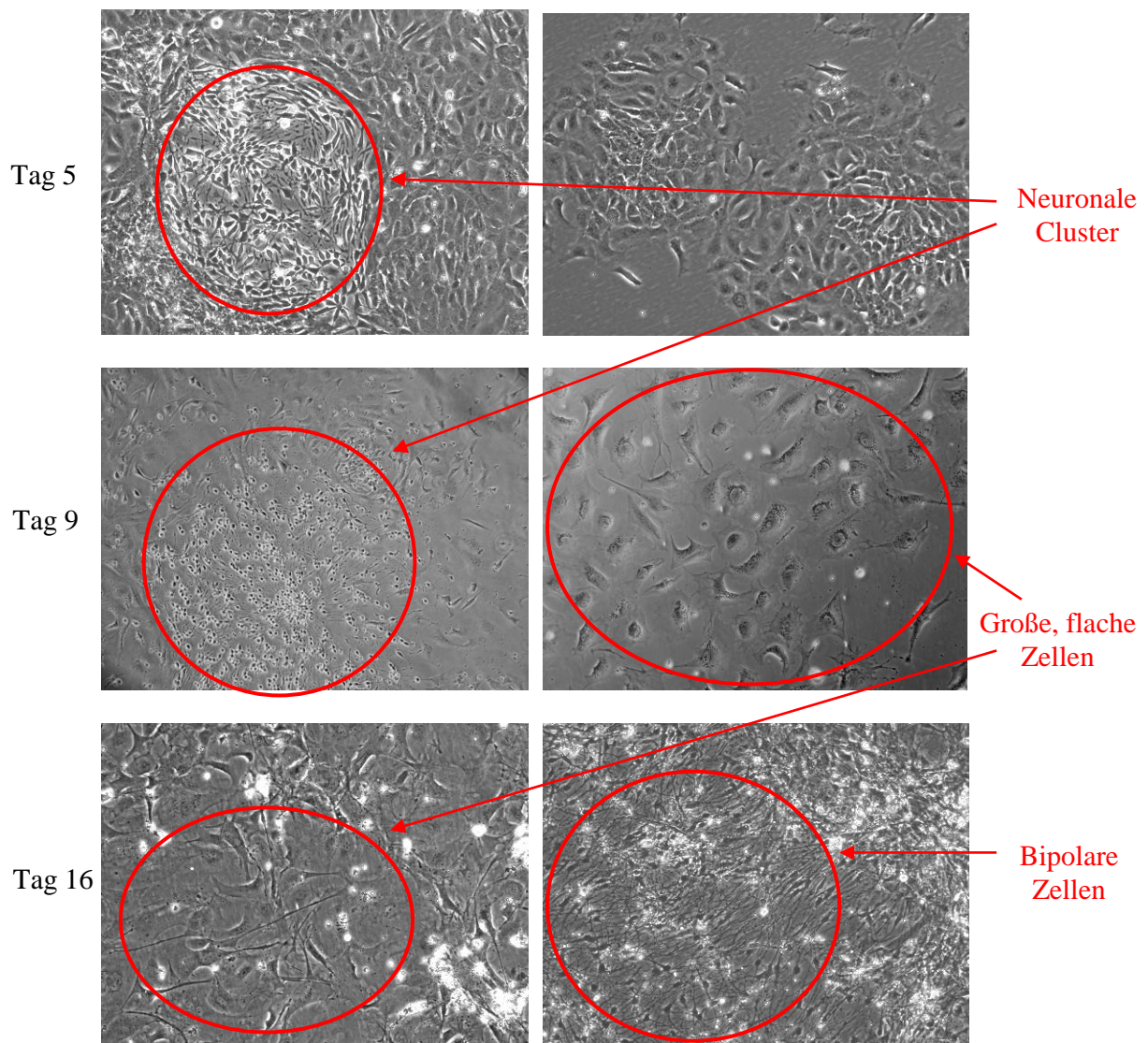


Abbildung 4.2 Morphologischer Verlauf der neuronalen Differenzierung mit Notch1-Aktivierung durch Zugabe von OHT EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und während der Differenzierung mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops unter Verwendung eines 10-fachen Objektives fotografiert. Notch1 wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum durch die Zugabe von 50 nM OHT aktiviert.

4.1.2 Induktion der Expression des Gliazellmarkerproteins GFAP und Verringerung des Neuronenvorläufermarkerproteins Tubb3 durch Aktivierung von Notch1

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss von Notch1 auf die neurale Differenzierung zu untersuchen, sind Immunfluoreszenzfärbungen von auf Deckgläschen angezogenen differenzierten Zellen. Mit dieser Methode ist es möglich, Zellen innerhalb einer Kultur nicht nur morphologisch, sondern auch durch den Nachweis von Proteinen, die spezifisch für bestimmte Zelltypen sind, zu identifizieren. Um festzustellen, ob Notch1 einen Einfluss auf die Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen hat, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung

von Zellen, die für 14 bis 16 Tage neural differenziert worden waren, durchgeführt. Dafür wurden der Gliazellmarker GFAP und der Neuronenvorläufermarker Tubb3 verwendet. Die Zellen wurden auf Deckgläschen in 24well-Platten angezogen, fixiert, permeabilisiert und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern inkubiert. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI verwendet. Notch1 wurde konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum durch die Zugabe von 50 nM OHT aktiviert.

Abbildung 4.3 zeigt die Färbung des Tubb3-Proteins an Tag 14 der neuralen Differenzierung. Stark gefärbt waren die langen Fortsätze der Zellen, deren Zellkern sich in den dicht gepackten Kolonien befindet. Diese Zellen waren in den Kulturen ohne Notch1-Aktivierung zahlreich vorhanden. In den Ansätzen mit Notch1-Aktivierung waren ebenfalls Tubb3-positive Zellen erkennbar. Diese waren jedoch fast nur in den unter 4.1.1 beschriebenen „neuronalen Clustern“ zu beobachten. Insgesamt waren nach Notch1-Aktivierung eindeutig weniger Tubb3-positive Zellen vorhanden. Zusätzlich unterschieden sich diese Zellen in der Morphologie deutlich von den Zellen ohne Notch1-Aktivierung. Es gab in Anwesenheit von Notch1 keine Zellen mit langen Fortsätzen, die in Bündeln organisiert waren und deren Zellkern in dicht gepackten Kolonien lokalisiert war. Nach Aktivierung von Notch1 waren die Tubb3-positiven Zellen immer bipolare oder multipolare Zellen mit vergleichsweise kurzem Fortsatz, die neuronalen Stammzellen ähnelten. Die Färbung und die Morphologie legten nahe, dass es sich um sehr frühe neuronale Vorläuferzellen handelte.

Aus Abbildung 4.4 geht hervor, dass sowohl mit als auch ohne Notch1-Aktivierung GFAP-positive Zellen entstehen. Diese Zellen waren nicht gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt, sondern immer in unterschiedlich großen „Clustern“ zu beobachten. Die Morphologie der einzelnen Zellen änderte sich nicht durch die Zugabe von OHT. Insgesamt gab es jedoch fast doppelt so viele GFAP-positive Bereiche in den Kulturen mit Notch1-Aktivierung gegenüber den Kulturen ohne Notch1-Aktivierung.

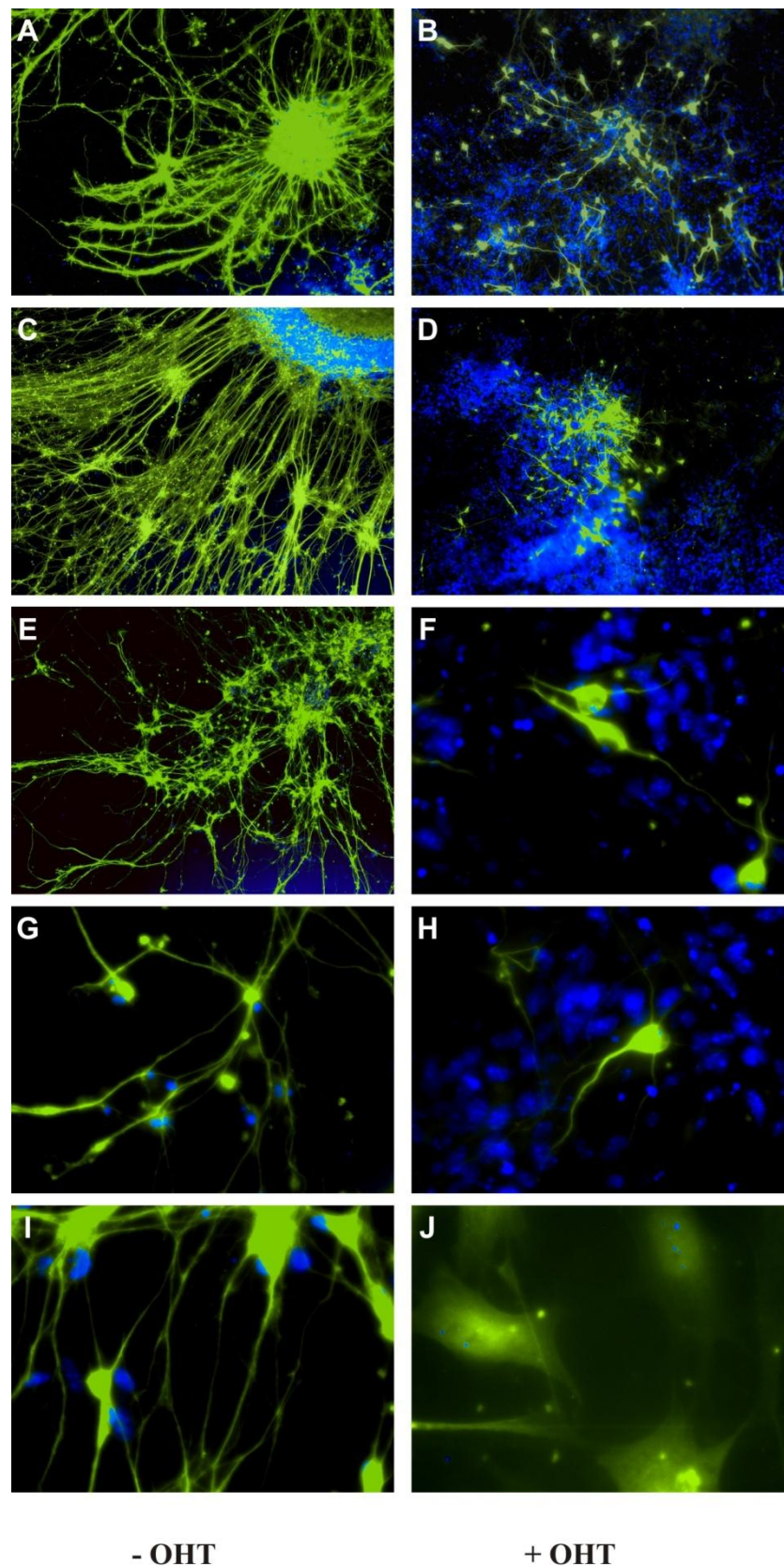


Abbildung 4.3 Immunfluoreszenzfärbungen des Neuronenvorläufermarkerproteins Tubb3 (grün)
 EB5-Nert Zellen wurden für 14 Tage neural differenziert. Die Aktivierung von Notch1 erfolgte durch die Zugabe von 50 nM OHT während des gesamten Differenzierungszeitraums. Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Das Experiment wurde drei Mal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. A-E: 10x-Objektiv, F-J: 63x-Immersionsobjektiv

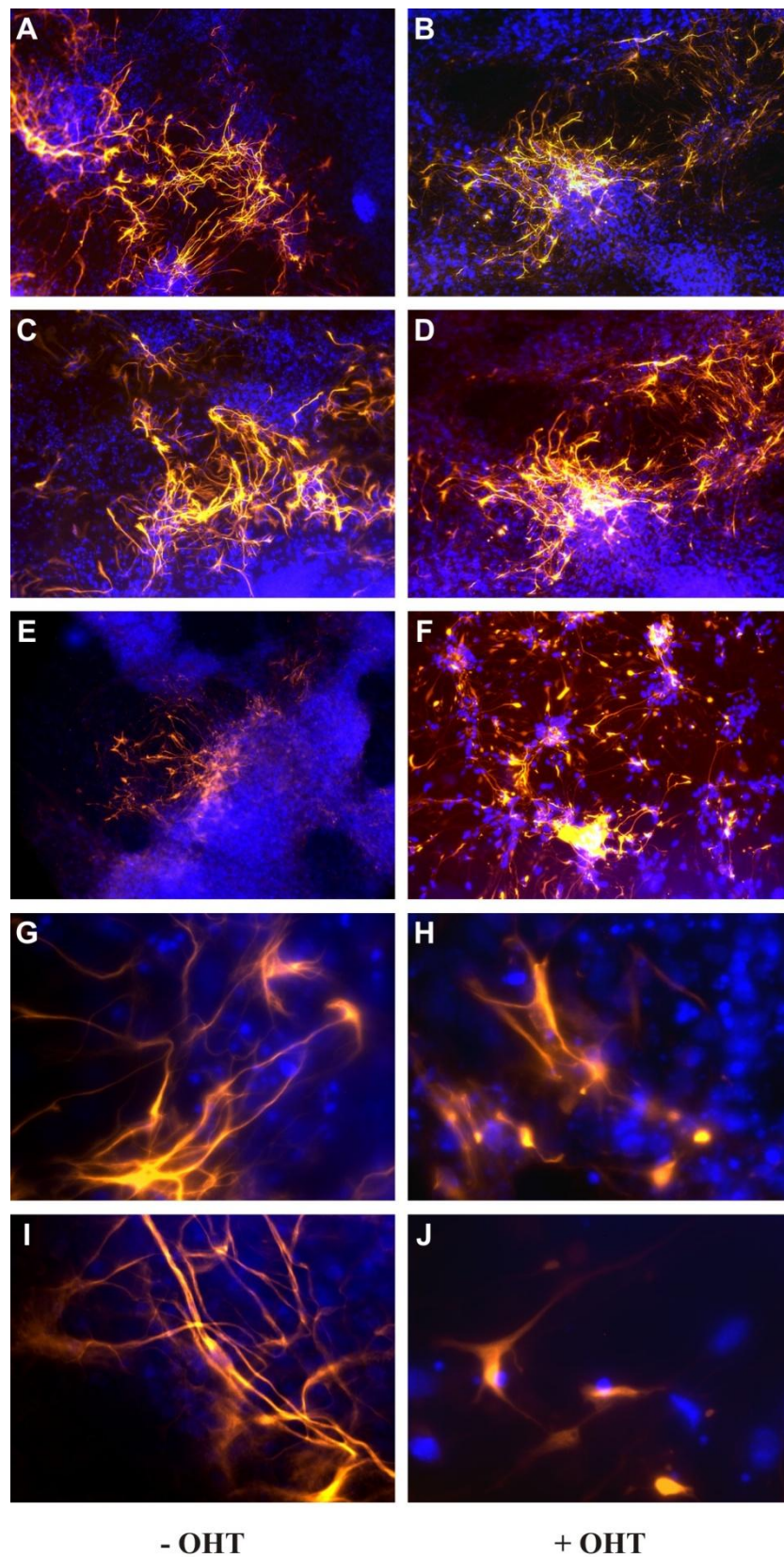


Abbildung 4.4 Immunfluoreszenzfärbungen des Gliamarkers GFAP (orange) EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert. Die Aktivierung von Notch1 erfolgte durch die Zugabe von 50 nM OHT während des gesamten Differenzierungszeitraums. Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Das Experiment wurde einmal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. A-F: 10x-Objektiv, G-H: 63x-Immersionsobjektiv

4.1.3 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von ausgewählten Markergenen verschiedener Entwicklungsstufen in EB5-Nert Zellen während der *in vitro* Differenzierung

Der Verlauf der Differenzierung mit und ohne Notch1-Aktivierung wurde mittels Real-Time PCR Analyse verfolgt, um den Erfolg der neuralen Differenzierung zu belegen und die Effekte, die Notch1 auf diese Differenzierung hat zu untersuchen. Dazu wurden RNA-Profile verschiedener Marker über einen Differenzierungszeitraum von 16 Tagen erstellt. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Zeitraum der Differenzierung oder lediglich in den ersten beiden Tagen durch die Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. Gezeigt ist jeweils ein Beispiel eines Expressionsverlaufs eines Markers (jeweils **A**) und die Induktion beziehungsweise Reduktion der Expression dieses Markers (jeweils **B**) durch die konstante beziehungsweise transiente Aktivierung von Notch1 (Abb. 4.5 bis 4.16).

4.1.3.1 Stammzellmarker und Marker für sehr frühe Embryonalentwicklung

Oct4 (auch *Oct3*, *Pou5f1*) ist ein Transkriptionsfaktor und gehört zur POU-Familie. Es wird während der frühen Embryonalentwicklung in der „Inneren Zellmasse“ (siehe 2.1) und *in vitro* in embryonalen Stammzellen exprimiert. Während der weiteren Entwicklung wird seine Expression in allen Zellen herunterreguliert. *Oct4* kann demnach als Marker für undifferenzierte, pluripotente embryonale Stammzellen genutzt werden. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, nahm die Expression von *Oct4* sowohl mit als auch ohne Notch1-Aktivierung im Verlauf der Differenzierung ab. Auffällig ist, dass die relative mRNA-Menge nach Aktivierung von Notch1 zu Anfang bis Tag 1 oder 2 erst einmal stieg und erst danach kontinuierlich abfiel. Dabei fiel das Level der Expression mit Notch1-Aktivierung unter das ohne Notch1-Aktivierung, was bedeutet, dass die Zellen nach Notch1-Aktivierung möglicherweise schneller oder vollständiger differenzieren als ohne.

Fgf5 gehört zur „Fibroblast growth factor“-Familie und wird in Zellen des primitiven Ektoderms bis zum Beginn der Gastrulation exprimiert. Außerdem ergibt sich bei erfolgreich neural differenzierenden embryonalen Stammzellen ohne Aktivierung von Notch ein Maximum der *Fgf5*-Expression ganz am Anfang der Differenzierung (Shen und Leder, 1992; Rathjen *et al.*, 1999; Pelton *et al.*, 2002). In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde *Fgf5* als indirektes Zielgen von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen identifiziert, welches herunterreguliert wird (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). In den Differenzierungsexperimenten dieser Arbeit war ein deutliches Maximum der relativen Expression an Tag 2 zu erkennen (Abb. 4.6), was darauf hindeutet, dass die Differenzierung der embryonalen Stammzellen unter den gewählten Bedingungen über die Entwicklung von primitivem Ektoderm (siehe 2.1) verlief. Die Zugabe von

OHT über den gesamten Zeitraum der Differenzierung oder für zwei Tage bewirkte eine starke Reduktion der *Fgf5*-Expression im Vergleich zur Differenzierung ohne OHT. Jedoch ließ sich auch hier eine höhere Expression bis zum Tag 2 und ein anschließender Abfall beobachten, was darauf schließen lässt, dass auch hier Zellen des primitiven Ektoderms entstanden. Diese Zellen exprimierten aber entweder weniger *Fgf5* oder es entstanden weniger *Fgf5*-exprimierende Zellen. Diese beiden Möglichkeiten lassen sich mit der Methode der Real-Time PCR nicht unterscheiden. Ob sich auch trophoblastische Zellen bildeten und ob andere Zellen als die des primitiven Ektoderms unter diesen Mediumbedingungen überlebten, wurde nicht untersucht.

Nestin gehört zu den Intermediärfilamentproteinen des Cytoskeletts und ist sowohl in neuronalen Stammzellen als auch in neuronalen Vorläuferzellen und Gliavorläufern, aber auch in anderen Geweben zum Beispiel während der Myogenese exprimiert (Lendahl *et al.*, 1990). In ausdifferenzierten reifen Zellen wird seine Expression herunterreguliert (Zimmerman *et al.*, 1994; Lothian und Lendahl, 1997). Ohne Notch1-Aktivierung ließ sich ein Maximum zwischen Tag 8 und Tag 10 erkennen (Abb. 4.7). Da die Expression von *Nestin* nach dem Maximum zwar abfiel, aber bis zum Ende der Differenzierungszeit vorhanden war, kann angenommen werden, dass neurale Stammzellen oder Vorläuferzellen mindestens bis zum Tag 16 existierten. Sowohl durch die konstante Zugabe von OHT als auch die Zugabe nur von Tag 0 bis Tag 2 erhöhte sich die Expression von *Nestin* mindestens bis zum Tag 12 stark. Da es Hinweise darauf gibt, dass *Nestin* ein direktes Zielgen von Notch1 ist (Meier-Stiegen *et al.*, 2010), muss die Zunahme der Expression durch konstante Aktivierung von Notch1 vorsichtig interpretiert werden. Eine Aktivierung von Notch1 an Tag 0 bis Tag 2 jedoch kann keine direkte Induktion von *Nestin* an späteren Tagen bewirken. Da die *Nestin*-Expression aber auch unter diesen Bedingungen konstant bis zum Tag 12 erhöht ist, kann angenommen werden, dass die Aktivierung von Notch1 eine Zunahme von unreifen Vorläufer- oder Stammzellen in der Kultur bewirkt.

Sox2 ist ein Transkriptionsfaktor und gehört zur „sex determinig region (SRY)-related HMG-box (SOX)“-Familie. Es ist ein oft genutzter Marker für neurale Stammzellen, wird aber auch in embryonalen Stammzellen exprimiert. In neuronalen Stammzellen führt *Sox2*-Expression zur Erhaltung des Stammzellcharakters und zur Inhibierung der weiteren neuronalen Differenzierung (Bylund *et al.*, 2003). Abbildung 4.8 zeigt, dass die Expression von *Sox2* während der neuronalen Differenzierung konstant blieb. Sowohl durch die konstante als auch durch die transiente Aktivierung von Notch1 sank die *Sox2*-Expression zu Beginn der Differenzierung unter die Expression ohne Notch1-Aktivierung. Dies deutet auf eine schnellere durch Notch1 induzierte Differenzierung hin. An Tag 10-12 nahm die *Sox2*-Expression nach Notch1-Aktivierung deutlich zu. Dies deutet möglicherweise auf eine zunehmende Anzahl von neuronalen Stammzellen und damit wahrscheinlich auf eine Proliferation dieser Zellen hin. Diese Möglichkeit wurde nicht näher untersucht. Eine weitere Erklärung für den späten Anstieg der *Sox2*-Expression nach

Notch1-Aktivierung ist die vermehrte Bildung von Schwannzell-Vorläufern oder „Satellite glia“ des peripheren Nervensystems, was zusätzlich auf eine Differenzierung in Neuralleistenzellen, aus denen das periphere Nervensystem hervorgeht hindeuten würde. Auch in Oligodendrozyten wird *Sox2* exprimiert (Wakamatsu et al., 2000). Notch begünstigt zwar die Bildung von Astrozyten gegenüber der von Oligodendrozyten, aber zuvor fördert es den „Switch“ von neuronaler Entwicklung zur Gliaentwicklung (Taylor et al., 2007), was auch zur vermehrten Bildung von Oligodendrozyten im Vergleich zu Experimenten ohne Notch1-Aktivierung führt (Yang et al., 2006). Die *Sox2*-Ergebnisse deuten darauf hin, dass es nach Notch1-Aktivierung entweder zu vermehrter Differenzierung in Gliazellen oder zur Proliferation von neuronalen Stammzellen kommt.

Pax6 gilt ebenfalls als Marker für neurale Stammzellen. Abbildung 4.9 zeigt, dass die Notch1-Aktivierung zu einem 2,1- bis 2,3-fachen Anstieg der *Pax6*-Expression während der ersten beiden Tage der Differenzierung führte. Anschließend erreichte die *Pax6*-Expression ohne Notch1-Aktivierung ein Maximum an Tag 8. *Pax6* ist stark in neuronalen Stammzellen exprimiert und fördert die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in neuroepitheliale Vorläuferzellen und in radiale Gliazellen (Suter et al., 2009). Es ist außerdem notwendig für den Eintritt in die Differenzierung in Neuronen. Sowohl eine konstante als auch eine transiente Notch1-Aktivierung führten nach dem ersten Anstieg der *Pax6*-Expression zu einer starken Reduktion im Vergleich zur Expression ohne Zugabe von OHT, gefolgt von einem leichten Anstieg zum Ende der Differenzierung. Dieser späte Anstieg könnte eine Verzögerung der Differenzierung bedeuten, was allerdings nicht die frühe Induktion durch OHT erklärt. Dass nach der ersten Induktion *Pax6* reprimiert wurde, deutet allerdings darauf hin, dass die durch *Pax6* bewirkte Spezifizierung in neuronale Zellen in den Kulturen mit Notch1-Aktivierung weniger effektiv erfolgte. Die Induktion der Expression durch OHT-Zugabe am Anfang der Differenzierung könnte darauf hin deuten, dass eine verstärkte Bildung von neuroepithelialen Vorläuferzellen oder radialen Gliazellen durch Notch1-Aktivierung erfolgte. Die transiente Notch1-Aktivierung führte zu einem ähnlichen Verlauf wie die konstante Aktivierung, was bedeutet, dass die Aktivierung am Anfang ausreichte, um die Differenzierung dauerhaft zu verändern.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die neurale Differenzierung unter den verwendeten Bedingungen der Entwicklung *in vivo* ähnelte und daher als System für die Untersuchung des Einflusses von Notch1 und seiner Zielgene in der neuronalen Differenzierung geeignet ist. Außerdem wurden durch die Notch1-Aktivierung höhere Werte für den Stammzell- und Vorläufermarker *Nestin* beobachtet, was darauf schließen lässt, dass Notch1 die Zellen in einem undifferenzierten Vorläuferstadium hielt und dieses Stadium durch die Aktivierung von Notch1 auch schneller erreicht wurde. Die Induktion des Markers *Pax6* deutet auf eine sehr schnelle oder verstärkte Bildung von neuroepithelialen oder radialen Gliazellen hin. Diese erhöhte

Expression wurde allerdings nicht über den Tag 3 hinaus erhalten, was entweder auf eine fortschreitende Differenzierung hindeuten könnte oder darauf, dass hier *Pax6*-negative radiale Gliazellen entstanden sind (Gotz *et al.*, 1998). Die Expressionswerte von *Oct4*, *Sox2*, *Nestin* und *Pax6* deuten darauf hin, dass die neurale Differenzierung am Anfang durch Notch1 beschleunigt wird.

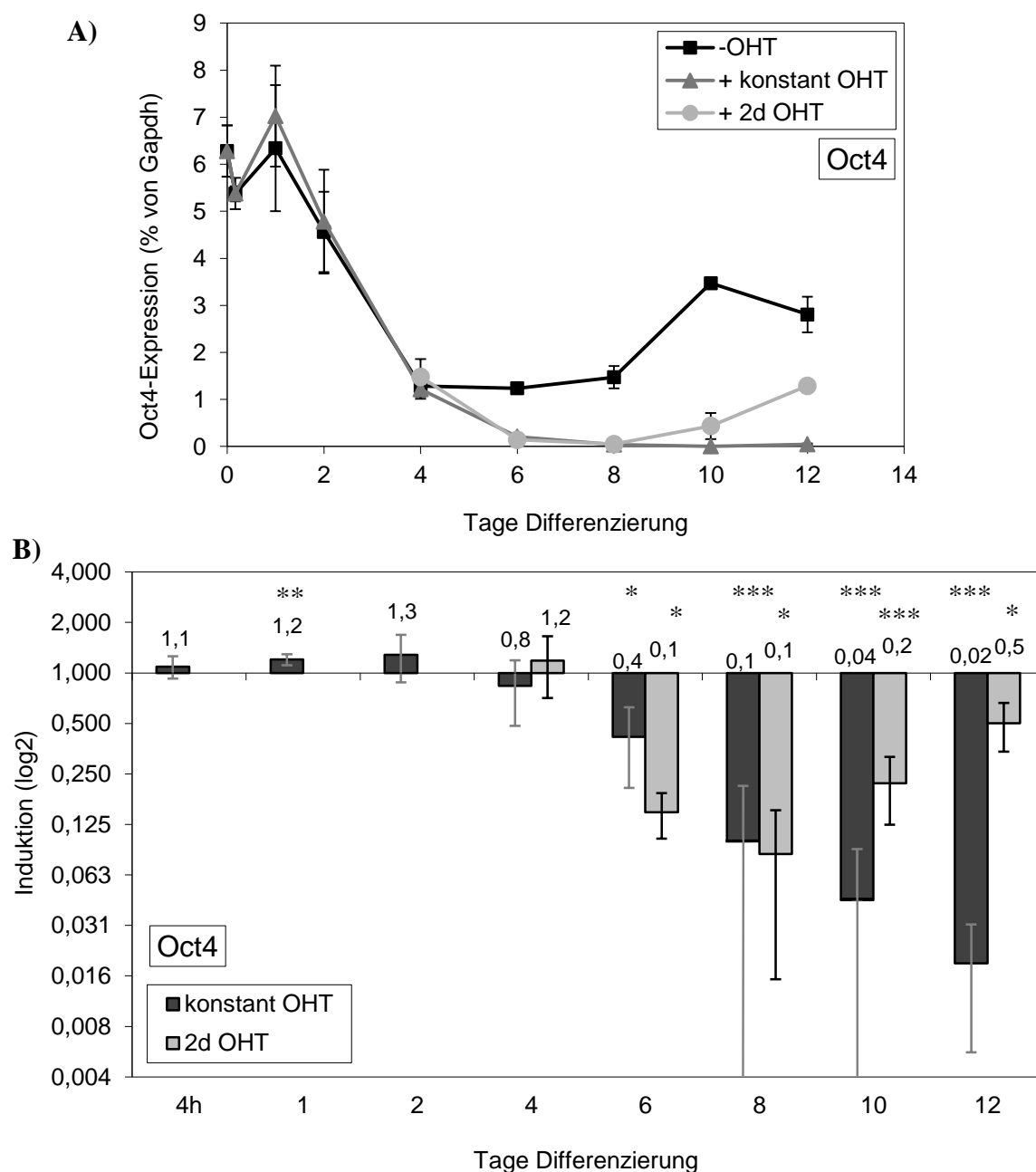


Abbildung 4.5 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Oct4* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 12 Tage neural differenziert und die *Oct4*-Expression mittels Real-TimePCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf *Gapdh* Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

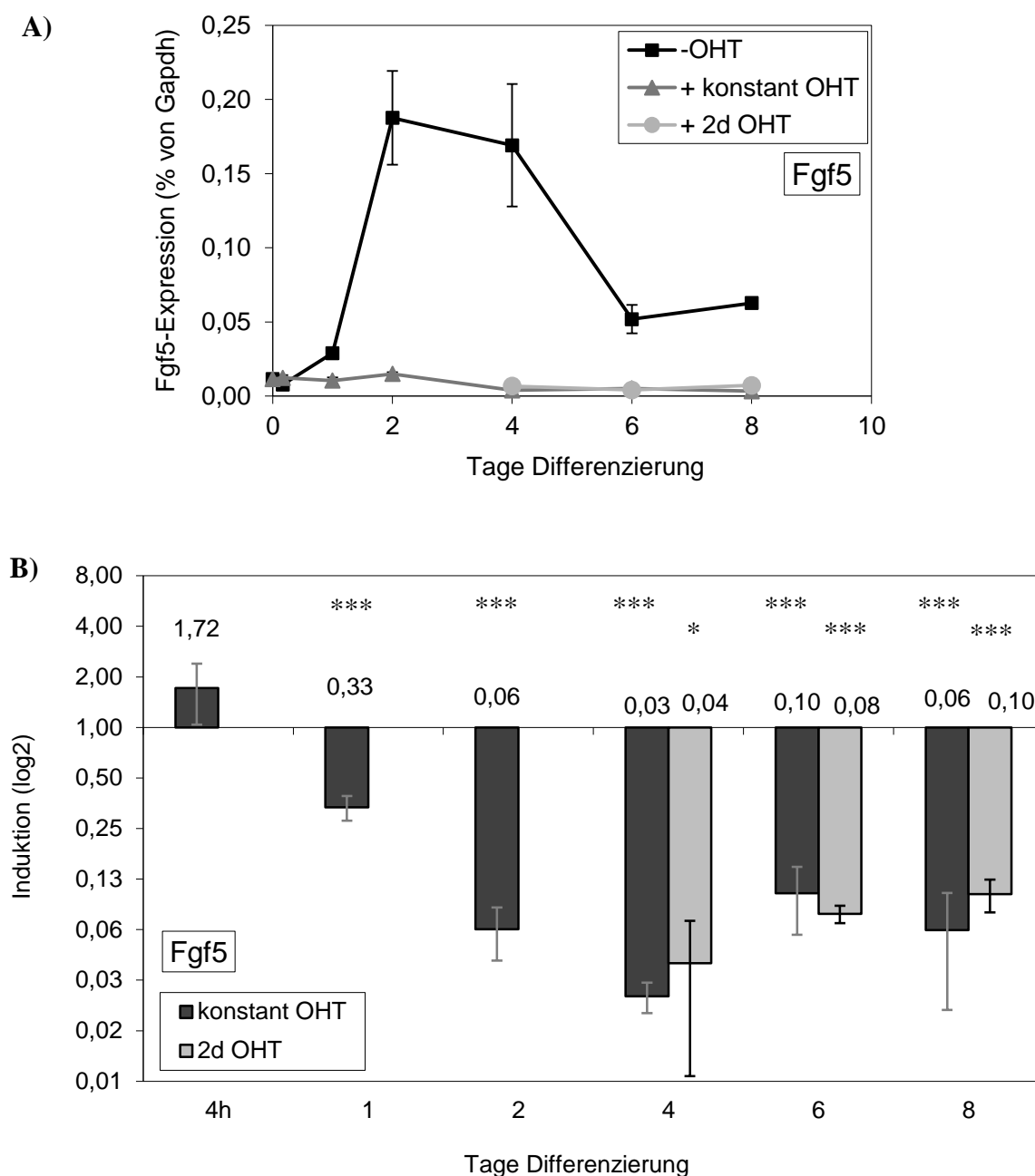


Abbildung 4.6 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Fgf5* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 8 Tage neural differenziert und die *Fgf5*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Gapdh Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

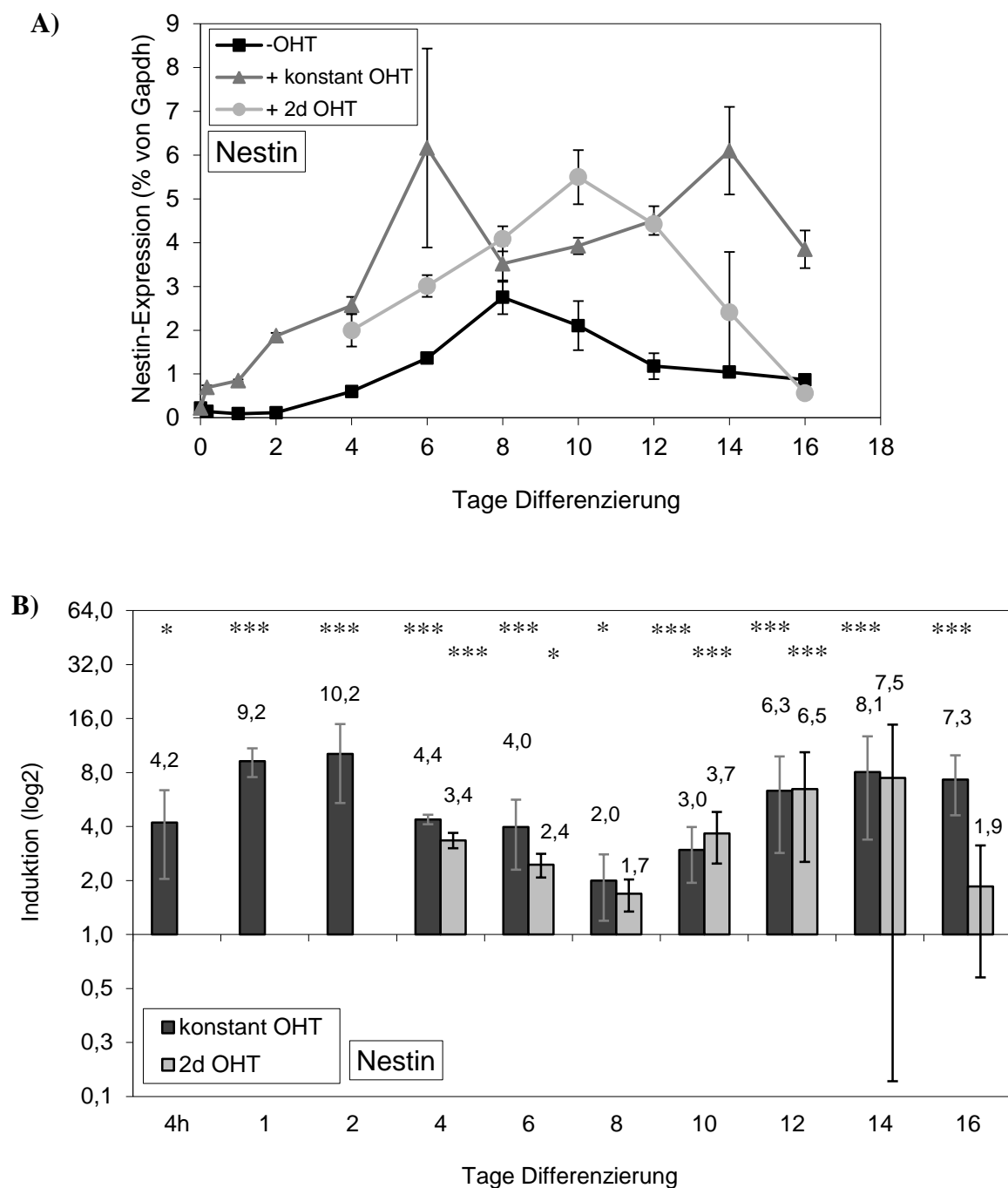


Abbildung 4.7 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Nestin* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die *Nestin*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf *Gapdh* Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

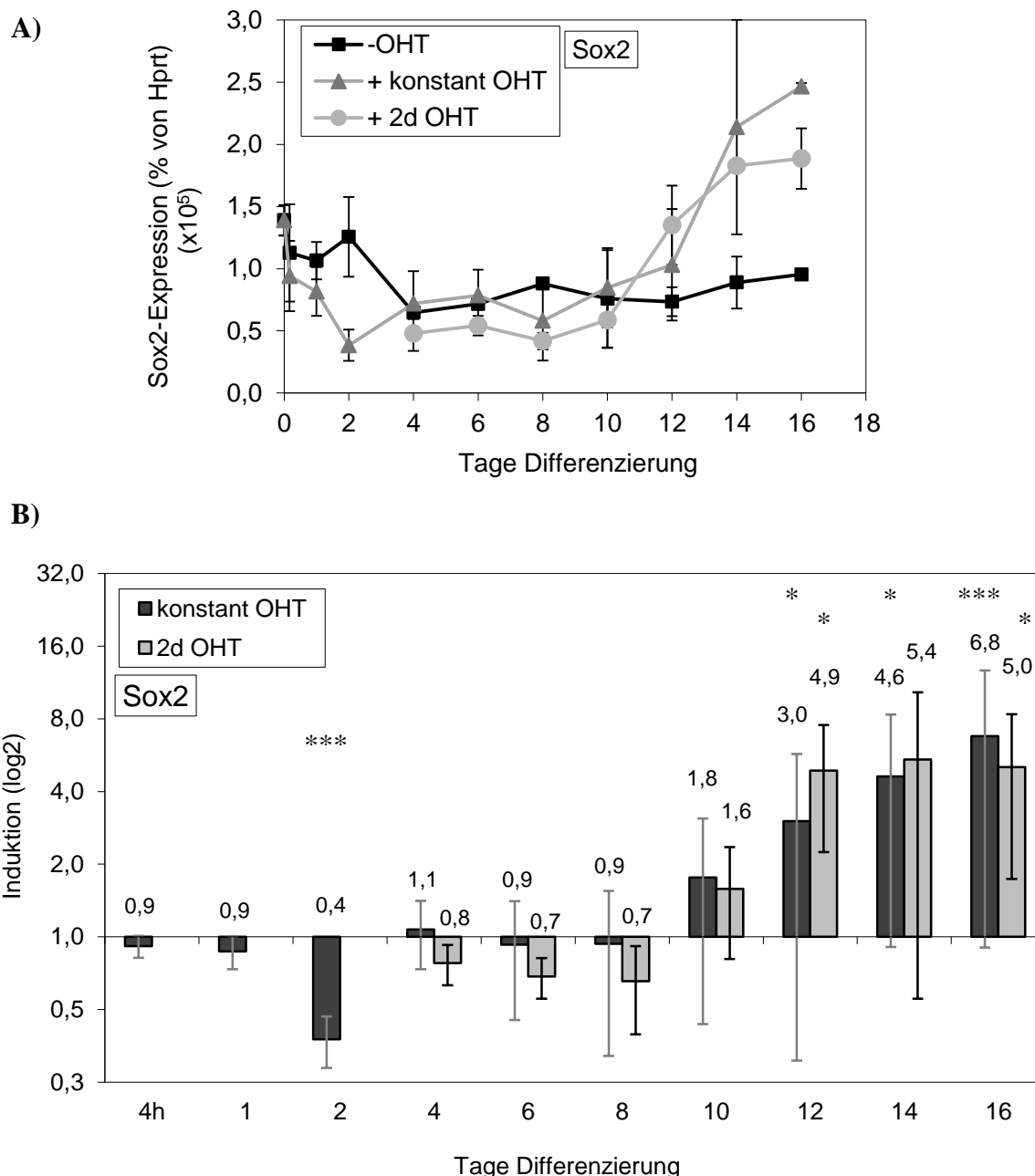


Abbildung 4.8 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von Sox2 während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die Sox2-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Hprt Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

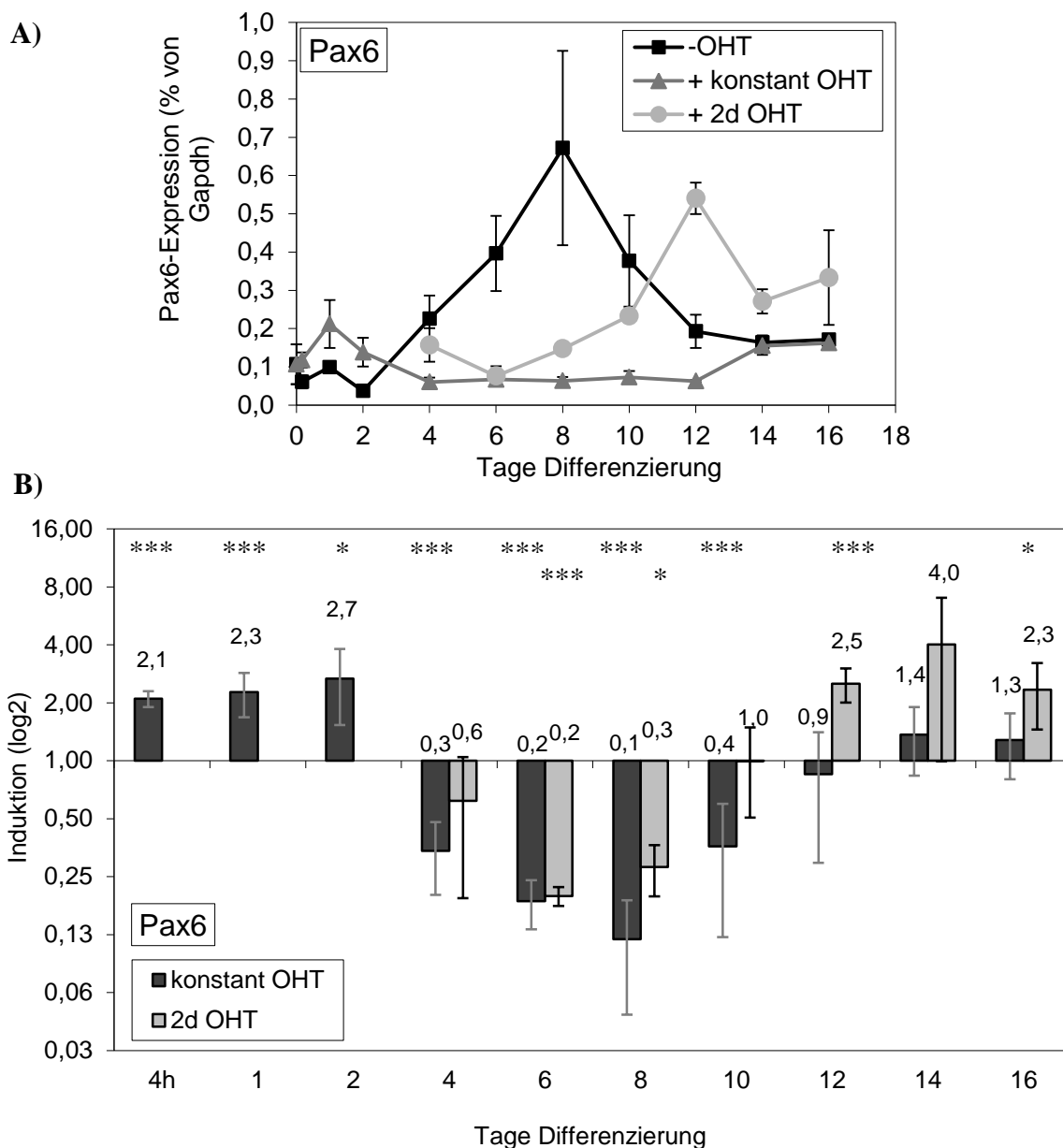


Abbildung 4.9 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Pax6* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die *Pax6*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf *Gapdh* Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

4.1.3.2 Endodermale und mesodermale Marker

Um zu bestimmen, wie stark die Zellen unter neuralen Kulturbedingungen in Endoderm und Mesoderm differenzieren, wurde jeweils ein Differenzierungsmarker für endodermale beziehungsweise mesodermale Zellen untersucht.

Brachyury (*T*) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Mesoderm-Spezifizierung während der Gastrulation beteiligt ist (Wilkinson *et al.*, 1990) und häufig als früher Marker für mesodermale Zellen genutzt wird. Abbildung 4.10 zeigt die *Brachyury*-Expression während der neuralen Differenzierung bezogen auf die Expression in mesodermalen Vorläuferzellen an Tag 4 der mesodermalen Differenzierung (blauer Punkt). Hier lässt sich erkennen, dass die *Brachyury*-Expression in neural differenzierenden Zellen vorhanden war, die Differenzierung also nicht ausschließlich neural verlief. Der Anteil an mesodermalen Zellen war allerdings sehr gering. Zusätzlich ließ sich nach Notch1-Aktivierung eine Reduktion der *Brachyury*-Expression ab Tag 8 der neuralen Differenzierung beobachten, was die Tatsache, dass Notch1 die mesodermale Differenzierung blockiert (Lowell *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006; Revinski *et al.*, 2010) bestätigt. Zu Beginn der Differenzierung an Tag 1 und 2 überstieg die Expression mit Notch1-Aktivierung die ohne Aktivierung. Eine mögliche Erklärung für die Induktion der *Brachyury*-Expression zu diesem Zeitpunkt ist eine veränderte Zeitkinetik durch die Aktivierung von Notch1. Sie könnte zu einer schnelleren Differenzierung führen. Hierbei würde es zu einer schnelleren Entwicklung von mesodermalen Vorläuferzellen kommen, deren Anteil aber immer noch weit unter dem Anteil der in den Kulturen ohne Notch1-Aktivierung später gebildeten mesodermalen Vorläufern liegen würde. Die These einer Beschleunigung der neuralen Differenzierung durch Notch1 wird durch die Expressionsverläufe der Marker *Oct4*, *Sox2*, *Nestin* und *Pax6* unterstützt. Hierbei ist auch zu beachten, dass *Brachyury* nicht nur in frühen mesodermalen Zellen exprimiert wird, sondern auch im Primitivstreifen, in der Chorda dorsalis, in extraembryonalen Geweben und anderen Orten des Mausembryos (Inman und Downs, 2006). Welche Subpopulationen gebildet wurden und ob *Brachyury* hier möglicherweise auf eine Notch1-Aktivierung reagiert, wurde nicht näher untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass Notch1 die *Brachyury*-Expression in der Seescheide *Ciona intestinalis* aktiviert (Corbo *et al.*, 1998) und in einigen Fällen die Zahl der *Brachyury*-positiven Zellen in *Xenopus*-Embryos erhöhen kann (Revinski *et al.*, 2010). Für die *Brachyury*-Expression allgemein ist aber zu beachten, dass sie sehr niedrig ist und der Anteil an mesodermalen Vorläuferzellen in den untersuchten Kulturen sehr gering sein dürfte.

Sox17 gehört zur „sex determinig region (SRY)-related HMG-box (SOX)“-Familie und wird während der Gastrulation in endodermalen Vorläuferzellen exprimiert (Kanai-Azuma *et al.*, 2002). In allen durchgeführten Messungen lag die *Sox17*-Expression sowohl mit als auch ohne Notch1-Aktivierung unter der Nachweisgrenze. Daher wird davon ausgegangen, dass keine oder

nur sehr wenige endodermale Zellen in den Differenzierungsansätzen vorhanden waren (Ergebnisse nicht gezeigt).

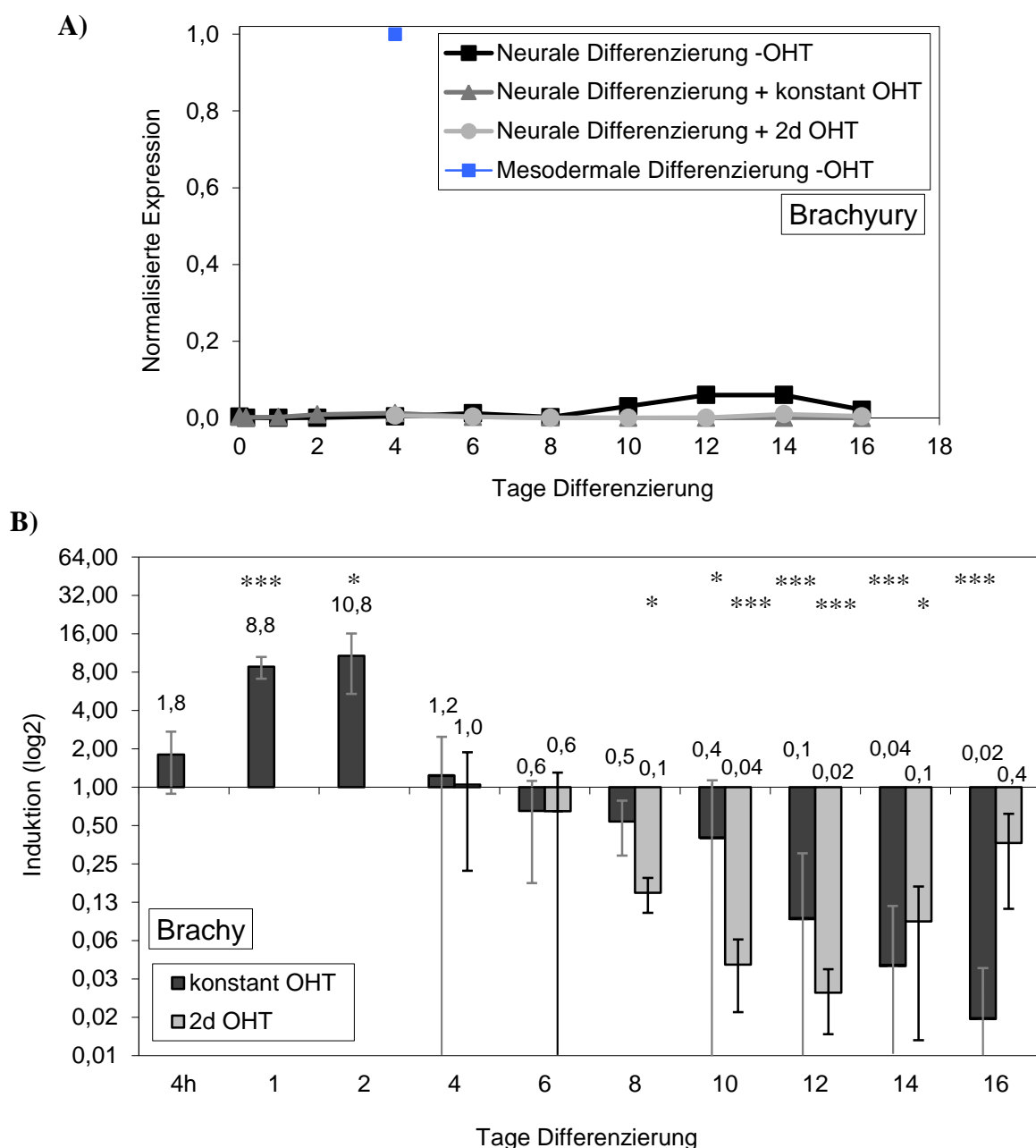


Abbildung 4.10 Vergleich der *Brachyury*-Expression während der mesodermalen und neuralen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural oder für 4 Tage mesodermal differenziert. Notch1 wurde während der neuralen Differenzierung entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf die Expression in mesodermalen Zellen Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt. Die Werte wurden auf HPRT normalisiert. Die Daten der neuralen Differenzierung wurden auf die Expression in mesodermalen Vorläuferzellen an Tag 4 der mesodermalen Differenzierung (blauer Punkt) bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde.

B) Induktion der Expression durch die Zugabe von 50 nM OHT Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten

4.1.3.3 Neuronale Marker und Marker für Gliavorläufer

Tubb3 (auch Beta-Tubulin-III oder TuJ1) ist ein Tubulin-Protein der Mikrotubuli des Cytoskeletts. Es ist spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen und unreifen Neuronen nicht aber in Gliavorläufern und auch nicht in murinen neuralen Stammzellen exprimiert. In den meisten ausgereiften Neuronen ist seine Expression herunterreguliert. Aus Abb. 4.11 wird ersichtlich, dass die *Tubb3*-Expression ohne Notch1-Aktivierung ab Tag 6 der Differenzierung anstieg, sein Maximum zwischen Tag 8 und Tag 10 erreichte und anschließend wieder abfiel. Das deutet darauf hin, dass die Zahl der neuronalen Vorläuferzellen besonders stark um den Tag 8 herum vorhanden sind, die Zellen anschließend ausdifferenzieren und somit die Expression von *Tubb3* herunterregulieren. Nach Notch1-Aktivierung nahm die Expression zunächst leicht ab, überstieg dann an Tag 4 die Expression ohne Notch1-Aktivierung und blieb anschließend sehr deutlich unter der Expression ohne Notch1-Aktivierung, wobei die *Tubb3*-Expression nach transientser Notch1-Aktivierung ein wenig über der Expression nach konstanter Aktivierung lag. Daraus lässt sich schließen, dass nach Notch1-Aktivierung sehr viel weniger neuronale Vorläufer und unreife Neuronen und somit auch weniger reife Neuronen entstanden und die Differenzierung für diesen Marker beschleunigt verlief. Außerdem war die Blockierung der neuronalen Differenzierung nach einer konstanten Aktivierung von Notch1 ein wenig effektiver als nach transientser Aktivierung.

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ist ein Intermediärfilamentprotein des Cytoskeletts und wird in Gliazellen und deren Vorläufern im zentralen und peripheren Nervensystem, nicht aber in murinen neuralen Stammzellen exprimiert. Seine Expression nahm während der neuronalen Differenzierung etwa ab Tag 10 zu, wobei sie sowohl durch die transiente als auch durch die konstante Aktivierung von Notch1 stark erhöht war (Abb. 4.12). Es entstanden also mit und ohne Notch1-Aktivierung Gliazellen oder deren Vorläufer, allerdings mit dem Unterschied, dass es nach Notch1-Aktivierung um ein Vielfaches mehr waren oder die vorhandenen Zellen viel mehr *GFAP* exprimierten. Auffällig ist ebenfalls, dass die transiente Aktivierung von Notch1 während der ersten beiden Tage der Differenzierung zu einer etwa 20-fachen höheren *GFAP*-Expression am Ende der Differenzierung führte als die konstante Aktivierung von Notch1. Dies lässt darauf schließen, dass eine Linienentscheidung zwischen Neuronen und Glia bereits in den ersten beiden Tagen der Differenzierung getroffen wird und eine weitere Aktivierung von Notch1 zu einer verringerten oder verzögerten Bildung von Gliazellen führt oder es sich um andere Gliazelltypen mit weniger *GFAP*-Expression handelt. Dies wurde nicht weiter untersucht.

Sox9 ist sowohl in neuralen Stammzellen als auch in Gliavorläufern, als auch in Neuralleistenzellen exprimiert (siehe 2.4). Abbildung 4.13 zeigt, dass sowohl eine transiente Notch1-Aktivierung während der ersten beiden Tage der neuronalen Differenzierung als auch eine dauerhafte Aktivierung einen starken Anstieg der *Sox9*-Expression in den ersten vier bis sechs Tagen und am Ende der Differenzierung bewirkten. Es ergab sich ein 2- bis 10-facher Anstieg,

der in der Mitte der Differenzierung nicht mehr signifikant war (Abb. 4.13 B). Da nach Zugabe von OHT während der ersten zwei Tage zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung keine *Sox9*-Induktion über OHT mehr erfolgen konnte, bedeutet dies, dass eine Notch1-Aktivierung am Anfang der Differenzierung bereits ausreichte, um den Differenzierungsverlauf dauerhaft zu verändern. Eine erhöhte Expression von *Sox9* deutet darauf hin, dass die Zellen sich entweder schneller zu neuronalen Stammzellen entwickeln oder anfangen in Richtung Gliavorläufer oder Neuralleistenzellen zu differenzieren. Dabei könnte die erhöhte Expression von *Sox9* am Anfang der Differenzierung auf eine Induktion der Neuralleiste oder auf ein früheres Auftreten von ebenfalls *Sox9*-positiven neuronalen Stammzellen hindeuten, was durch die ebenfalls sehr früh induzierte Expression von *Nestin* und *Pax6* unterstützt werden würde. Die spätere verstärkte Expression könnte auf eine vermehrte Bildung von Gliazellen hinweisen, was mit einer ebenfalls erhöhten *GFAP*-Expression korreliert. Dabei stieg die Expression nach transientser Aktivierung von Notch1 schneller an, was darauf hindeutet, dass die Spezifizierung von Gliazellen in diesem Fall schneller erfolgte, was ebenfalls zur stärker erhöhten *GFAP*-Expression nach transientser Notch1-Aktivierung passt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Notch1-Aktivierung die Entstehung von Gliavorläufern begünstigte und die Bildung von neuronalen Vorläuferzellen inhibierte und dass diese Effekte sich bereits mit einer transienten Aktivierung von Notch1 während der ersten beiden Tage der Differenzierung erreichen lassen.

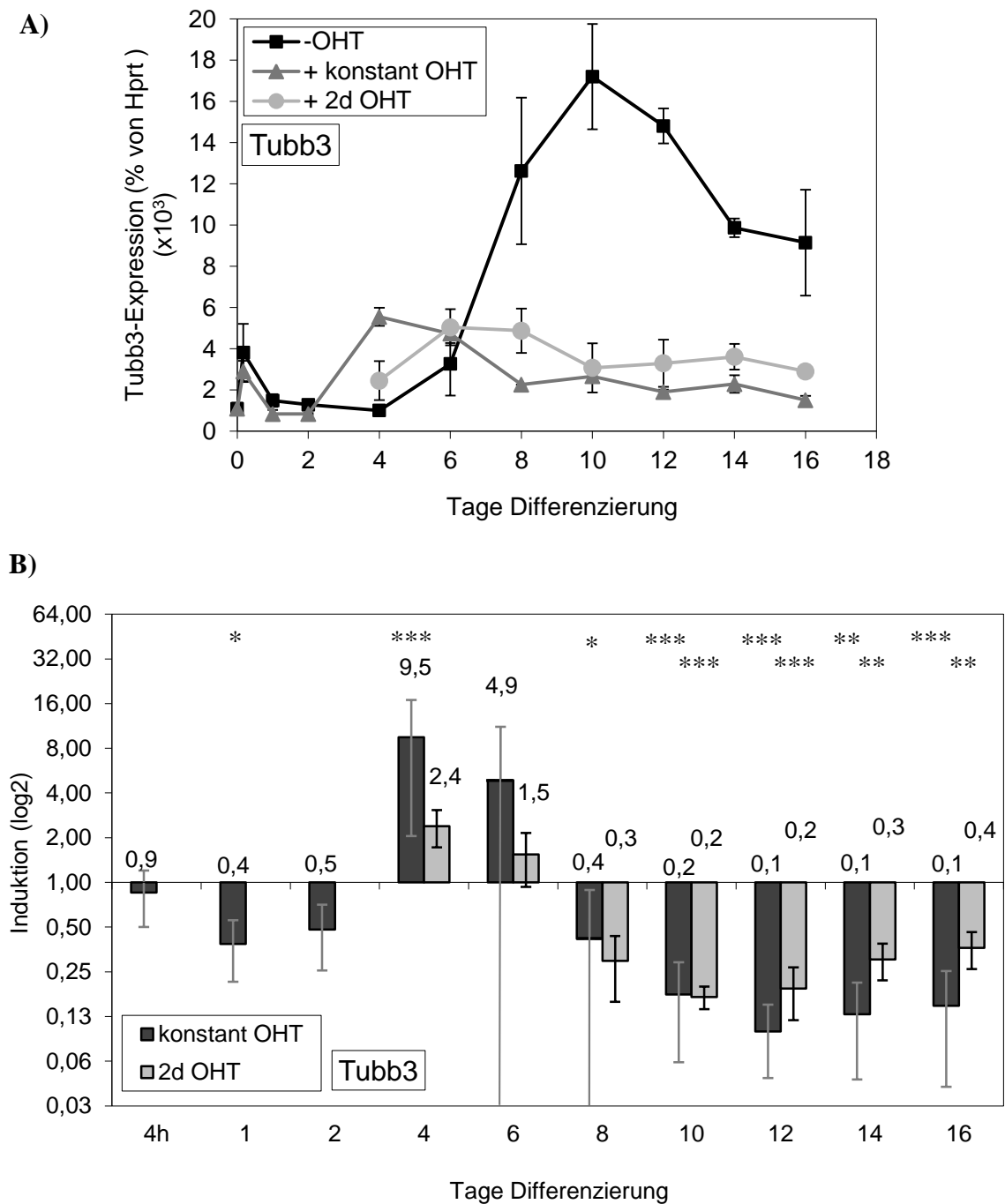


Abbildung 4.11 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Tubb3* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die *Tubb3*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Hprt Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

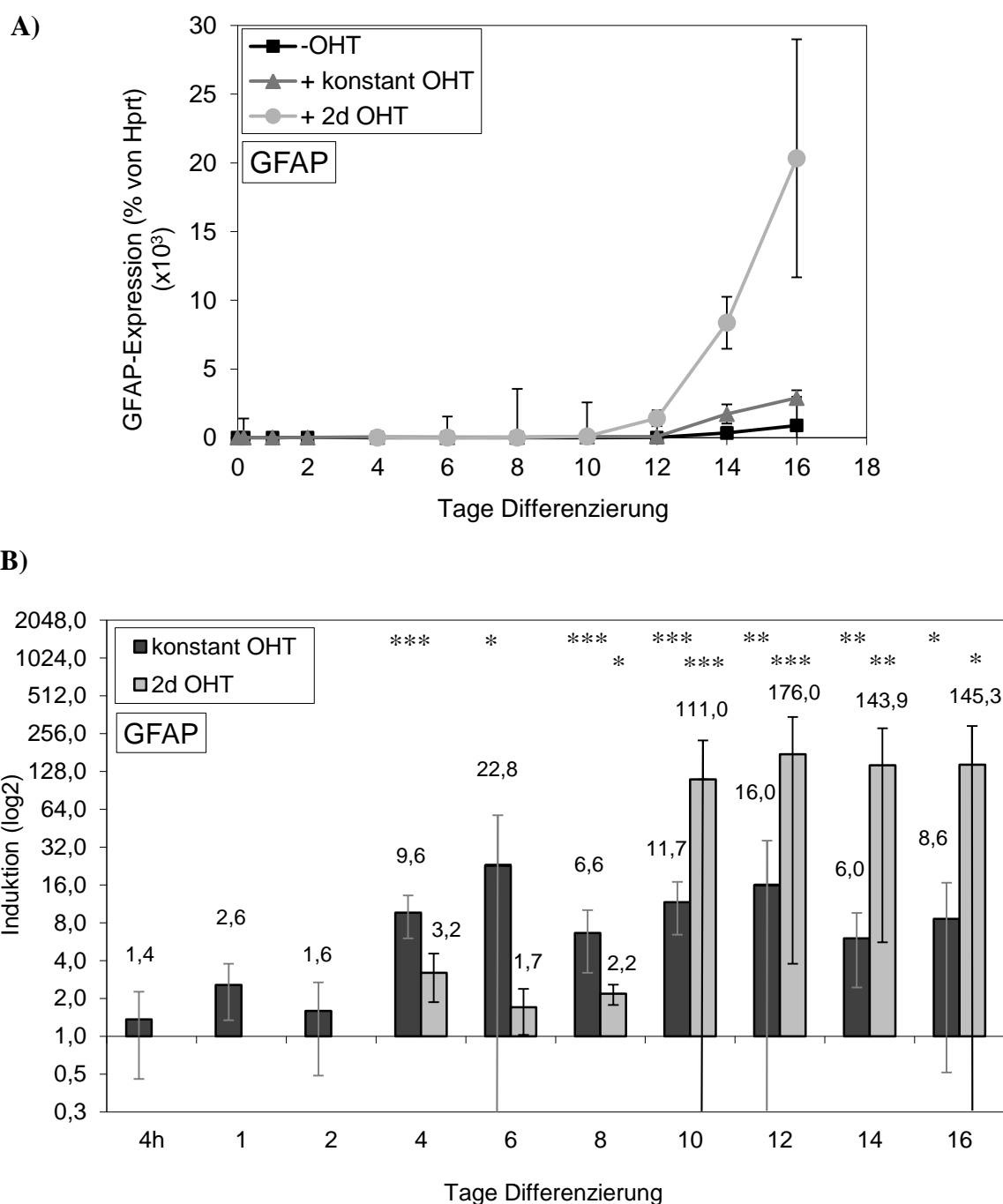


Abbildung 4.12 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *GFAP* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die *GFAP*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf *Hprt* Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

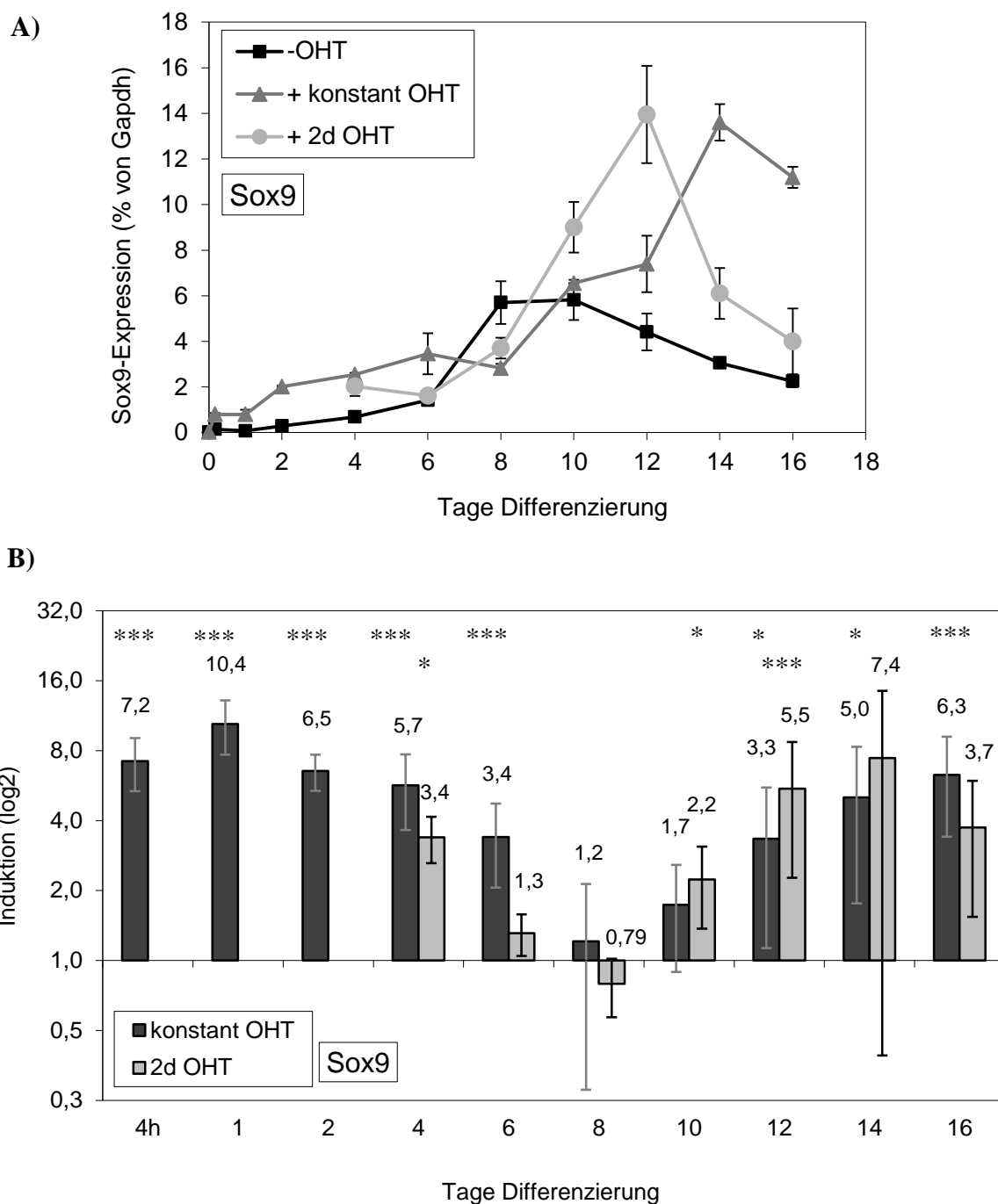


Abbildung 4.13 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von Sox9 während der neuralen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die Sox9-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Gapdh Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

4.1.3.4 Neuralleistenmarker

Snai1 (*Snail*) und ***Snai2*** (*Slug*) sind Zinkfingerproteine, die als transkriptionelle Repressoren unter anderem an den E-Cadherin-Promotor binden und damit die Expression dieses Adhäsionsproteins inhibieren (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000). Zellen können so ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und migrieren. Diese Veränderung wird Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) genannt und findet während der Embryonalentwicklung unter anderem bei der „Einwanderung“ des Mesoderms im Zuge der Gastrulation und auch bei der Loslösung der Neuralleistenzellen vom Rand der Neuralplatte während der Neurulation statt. Zusätzlich sind beide Proteine für die Spezifizierung und die Migration der Neuralleistenzellen erforderlich und werden als Marker für diese verwandt (Steventon *et al.*, 2005). Außerdem besitzen sie unter anderem während der Neuralleistenentwicklung antiapoptotische Eigenschaften (Tribulo *et al.*, 2004; Vega *et al.*, 2004). Abbildungen 4.14 und 4.15 zeigen die relativen Expressionen von *Snai1* und *Snai2* während der neuralen Differenzierung. Die Induktion von Notch1 durch Zugabe von OHT führte zu einer stark gesteigerten Expression von Tag 4 an bis zum Ende des Untersuchungszeitraums. Dabei resultierte die transiente Aktivierung in einer konstant niedrigeren Expression der beiden Marker als die konstante Aktivierung, die zusätzlich gegen Ende der Differenzierung wieder abnahm. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt der transienten Notch1-Aktivierung am Ende der Differenzierung wieder abnimmt und die Zellen möglicherweise weiter differenzieren. Da nach Aktivierung von Notch1 während der Differenzierung weniger Mesoderm entstand als ohne Aktivierung, kann davon ausgegangen werden, dass der Anstieg der *Snai1*- und *Snai2*-Expression nicht durch ein vermehrtes Auftreten von mesodermalen EMTs erzeugt wurde.

Foxd3 (Forkhead box D3) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Erhaltung von embryonalen Stammzellen (Tamura *et al.*, 1995; Hanna *et al.*, 2002; Liu und Labosky, 2008) und der Entwicklung von früher Differenzierungskompetenz durch die Demethylierung von entwicklungsspezifischen Enhancern lange bevor die Differenzierung beginnt (Xu *et al.*, 2009) beteiligt ist. Zusätzlich stellt er einen Marker für Neuralleistenzellen vor dem Start der Migration dar (Steventon *et al.*, 2005). Hier ist er für die Erhaltung von Neuralleistenvorläuferzellen notwendig (Teng *et al.*, 2008). Wie aus Abbildung 4.16 ersichtlich wird, sank die *Foxd3*-Expression mit Notch1-Aktivierung in den frühen Tagen der Differenzierung, wobei sie unter das Level der Expression ohne Notch1-Aktivierung fiel. Dies deutet darauf hin, dass die Differenzierung durch Notch1-Aktivierung induziert wird und die Zellen schneller den Charakter von embryonalen Stammzellen verlieren. Diese Beobachtung wird durch die *Oct4*- und die *Sox2*-Expression, die nach Notch1-Aktivierung ebenfalls schneller abnimmt, bestätigt. Ab Tag 4 stieg sie nach Zugabe von OHT stark an und überstieg dabei die Expression ohne Zugabe von OHT deutlich. Nach konstanter Notch1-Aktivierung fiel die *Foxd3*-Expression nach einem Maximum

an Tag 6 leicht ab, während sie nach transienter Aktivierung nach dem Maximum an Tag 6 auf das Niveau der Expression ohne Notch1-Aktivierung zurückfiel. Zu diesem Zeitpunkt deutet die erhöhte *Foxd3*-Expression vermutlich auf eine verstärkte Bildung von Neuralleistenzellen hin.

Id3 gehört zur Id-Familie (Inhibitor of DNA binding or of differentiation), deren Mitglieder die Bindung von bHLH-Transkriptionsfaktoren an die DNA inhibiert. Es ist während der Gastrulation im gesamten Embryo und anschließend sowohl im ventralen, als auch im dorsalen Teil des Neuralrohrs exprimiert, aus dem sich die Neuralleiste entwickelt. Im weiteren Verlauf der Neurogenese findet sich die *Id3*-Expression in den sich teilenden Neuroblasten, aus denen später, wenn die *Id3*-Expression wieder abnimmt, die Neuronen hervorgehen (Jen *et al.*, 1997). Es verstärkt die Selbsterneuerung und die Proliferation von kortikalen neuronalen Stammzellen und inhibiert, wahrscheinlich über *Hes1*, die weitere neuronale Differenzierung (Bai *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010). Zusätzlich dazu erhält es Neuralleistenvorläuferzellen in ihrem undifferenzierten Vorläuferstadium. Es hält die Expression von Proteinen (zum Beispiel *Sox10* und *Snai2*) aufrecht, die während der weiteren Neuralleisten-Differenzierung herunterreguliert werden müssen, um die Entstehung ausgereifter Zellen zu ermöglichen (Light *et al.*, 2005). Die Expression von *Id3* wurde durch die Aktivierung von Notch1 stark erhöht (Abbildung 4.17). Sowohl mit als auch ohne Notch1-Aktivierung erreichte die Expression ein Maximum zwischen Tag 8 und Tag 12, was darauf hin deutet, dass zu diesem Zeitpunkt besonders viele unreife neuroektodermale Vorläuferzellen vorhanden waren. Dies wird bestätigt durch die Expressionsverläufe von *Pax6* und *Nestin*. Die erhöhte *Id3*-Expression nach Notch1-Aktivierung lässt auf eine beschleunigte und verstärkte Bildung von neuronalen Vorläuferzellen zu Beginn der Differenzierung schließen. Die sehr hohe Expression im weiteren Verlauf der Differenzierung deutet darauf hin, dass diese Zellen in ihrem unreifen Stadium erhalten werden. Ob sie in diesem Fall zum zentralen Nervensystem oder zur Neuralleiste gehören, kann mit Hilfe dieses Markers nicht abschließend geklärt werden. Nach transienter Notch1-Aktivierung fiel die *Id3*-Expression ab Tag 12 stärker ab, was, wie auch im Fall von *Snai1* und *Snai2*, darauf hindeutet, dass der durch Notch1 induzierte Effekt am Ende der Differenzierung abnimmt und die Zellen weiter ausdifferenzieren.

Sox9 wird ebenfalls als Marker für frühe Neuralleistenvorläuferzellen verwendet und zusätzlich unter anderem in einigen migrierenden Neuralleistenzellen und Chondrozyten, Herz- und Skelettzellen mit Neuralleistensprung exprimiert (Hong und Saint-Jeannet, 2005). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte festgestellt werden, dass die *Sox9*-Expression unter neuronalen Differenzierungsbedingungen in der ersten Hälfte und am Ende der Differenzierung durch die Aktivierung von Notch1 stark ansteigt (siehe Abbildung 4.13 unter 4.1.3.3). Eine Induktion der Differenzierung in Neuralleistenzellen durch Notch1 ist eine mögliche Erklärung.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl durch transiente als auch durch konstante Notch1-Aktivierung die Expression von Neuralleistenmarkern erhöht wurde. Diese

Induktion fand meistens ab etwa Tag 4 der Differenzierung statt, was darauf schließen lässt, dass der Beginn der Bildung der Neuralleiste auf diesen Zeitpunkt fiel. Der durch die transiente Aktivierung von Notch1 erzielte Effekt nahm gegen Ende der Differenzierung wieder ab. Die Expression von *Snai1*, *Snai2* und *Id3* deutet darauf hin, dass die Zellen durch Notch1-Aktivierung in einem unreifen Vorläuferstadium erhalten wurden.

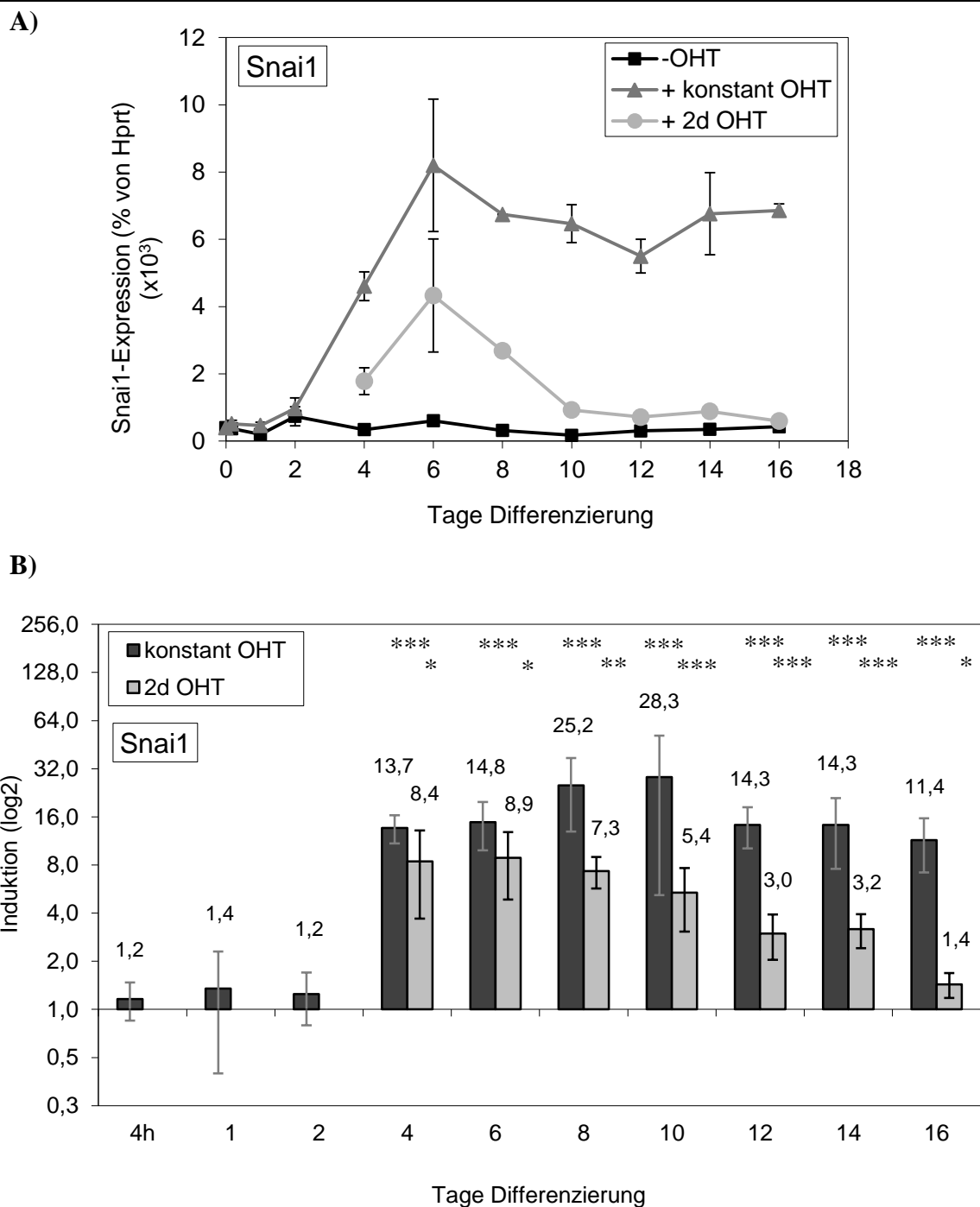


Abbildung 4.14 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Snail* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die *Snail*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Hprt Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

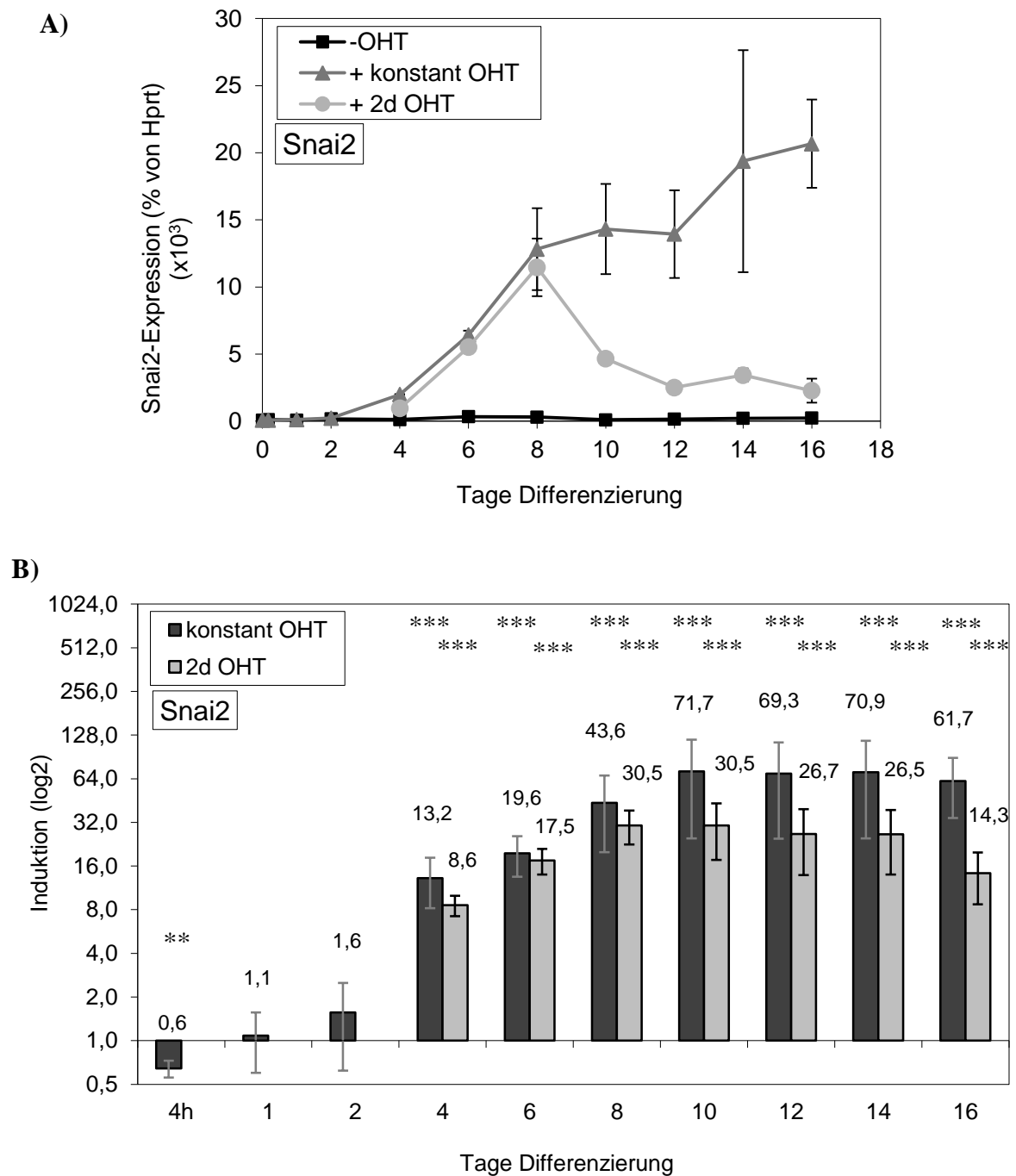


Abbildung 4.15 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Snai2* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die *Snai2*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Hprt Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

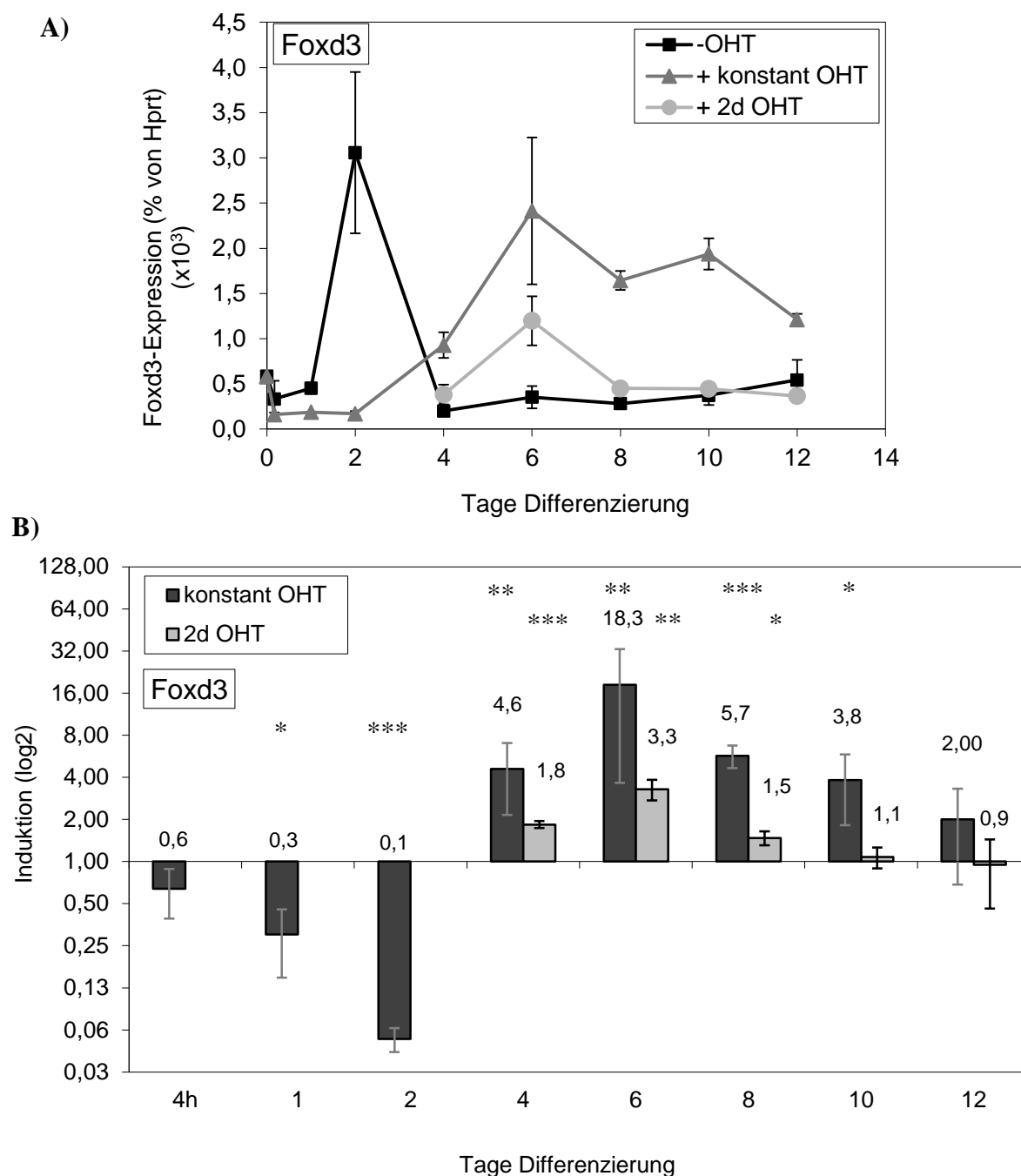


Abbildung 4.16 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Foxd3* während der neuronalen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 12 Tage neural differenziert und die *Foxd3*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Hprt Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

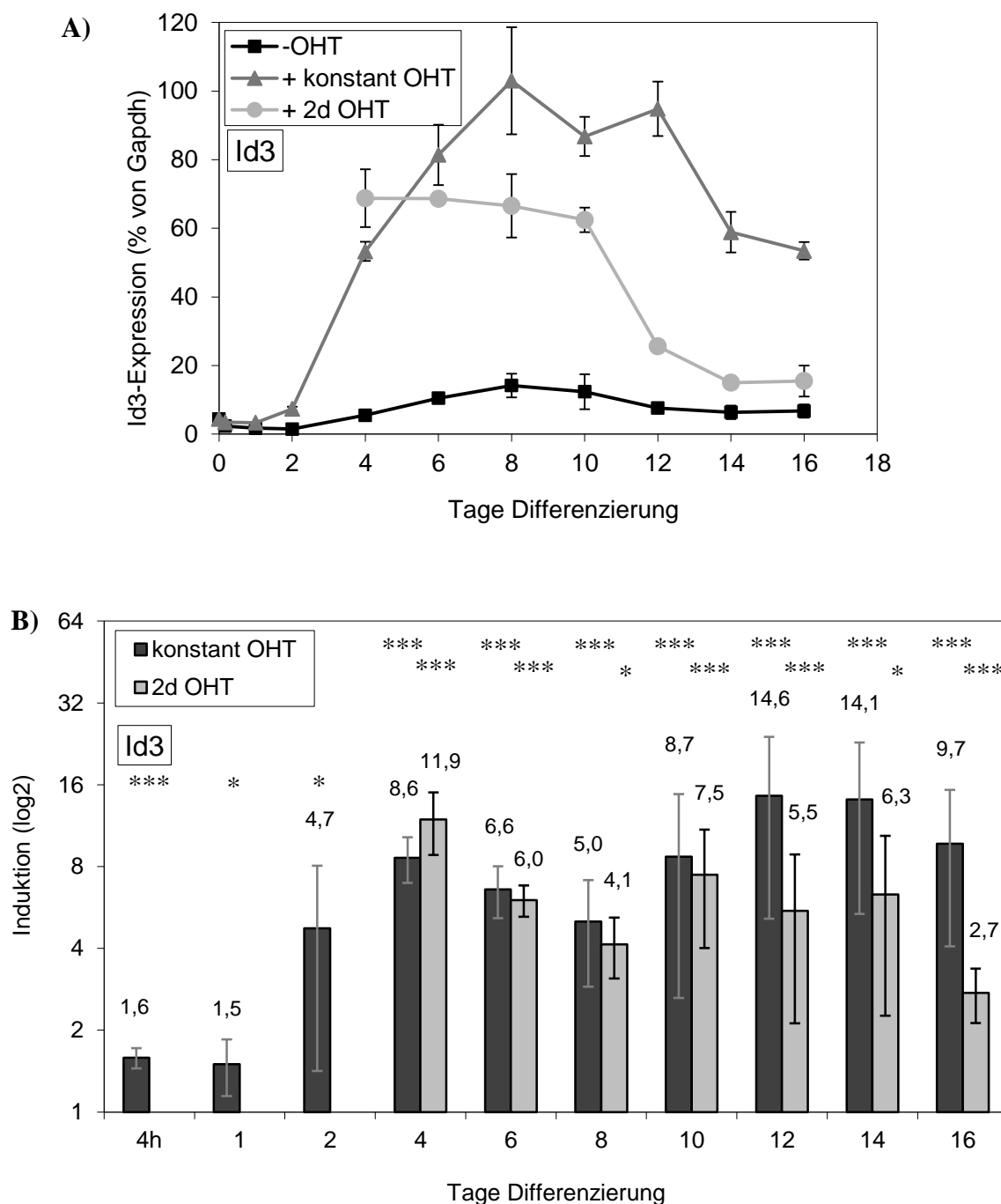


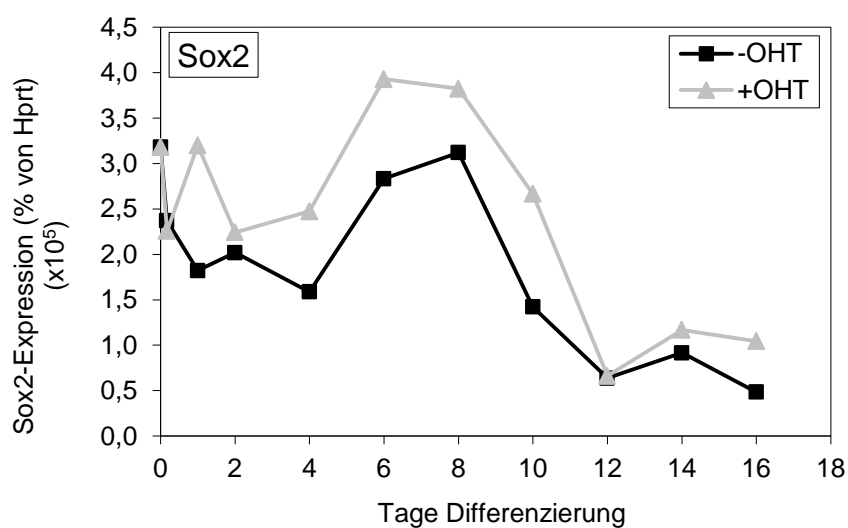
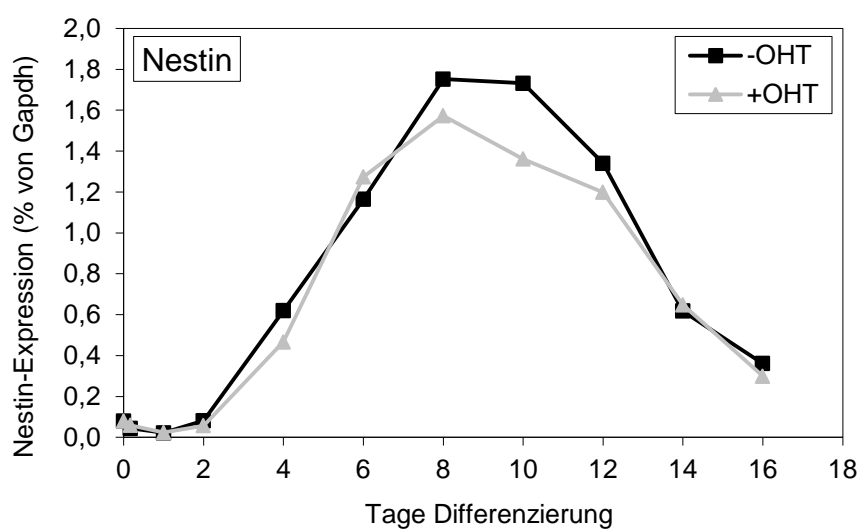
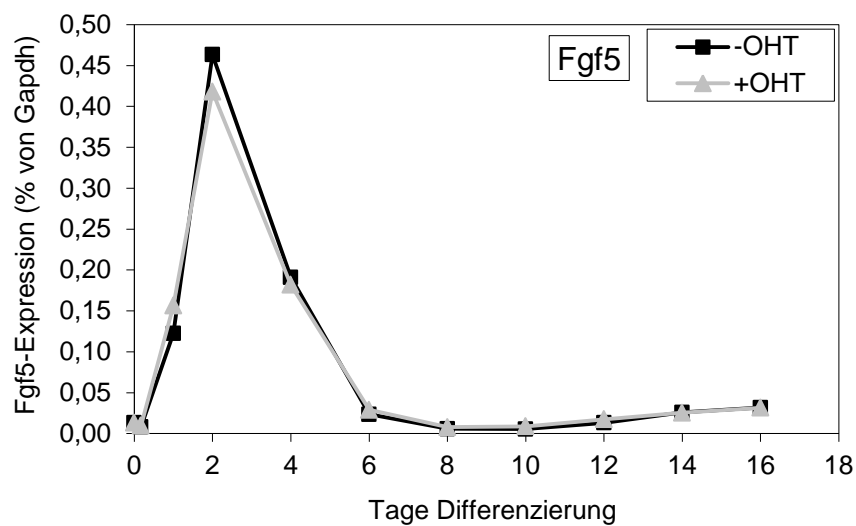
Abbildung 4.17 Einfluss von Notch1 auf die mRNA-Expression von *Id3* während der neuralen Differenzierung EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die *Id3*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

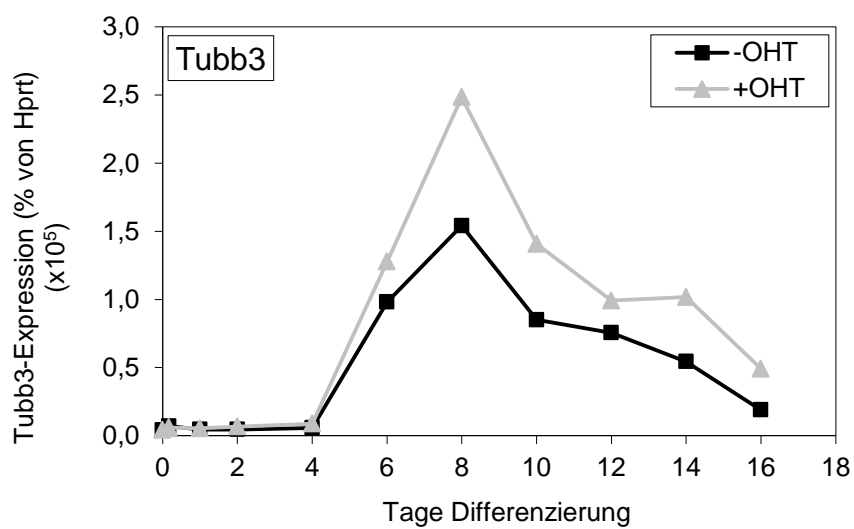
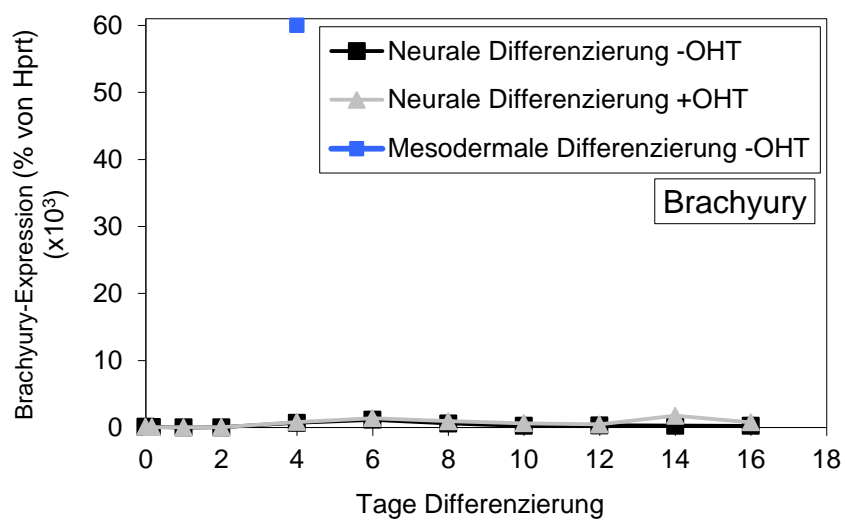
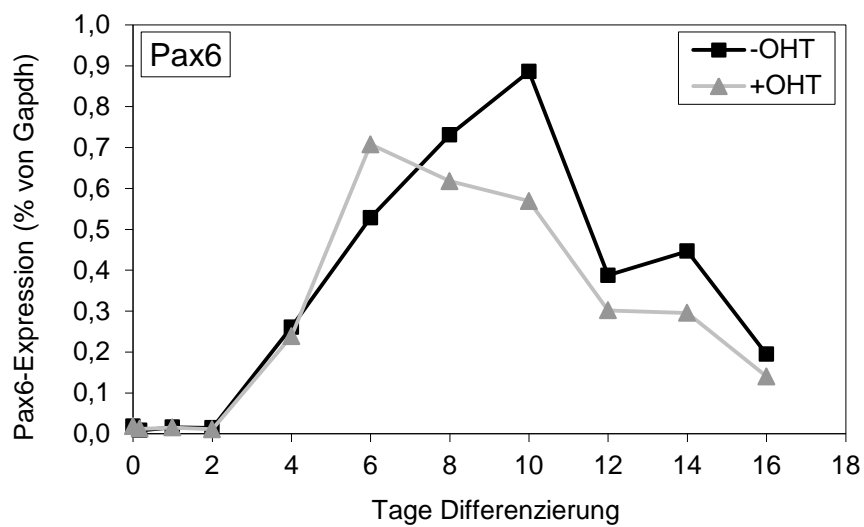
A) Relative Expression bezogen auf *Gapdh* Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung eines Duplikats eines Experiments. Das Experiment wurde vier- bis siebenmal (ohne OHT und konstant OHT) oder drei- bis fünfmal (2d OHT) mit inhaltlich ähnlichem Ergebnis wiederholt.

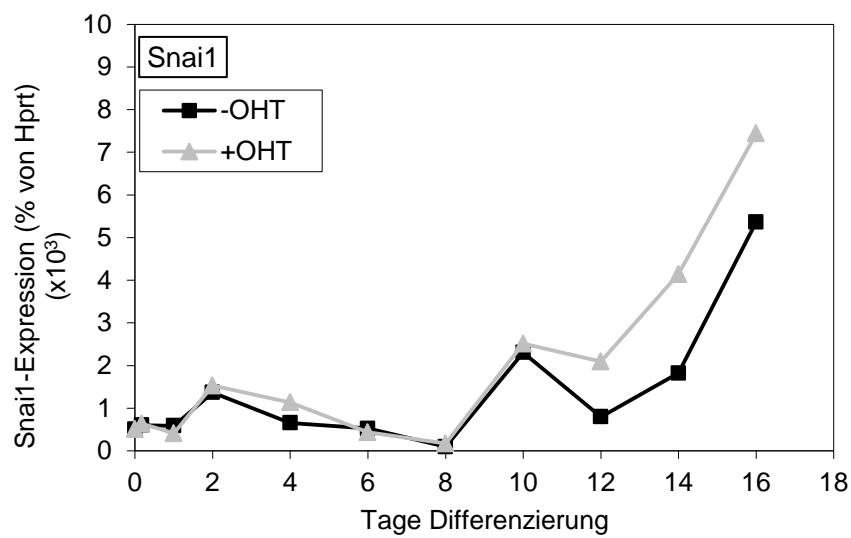
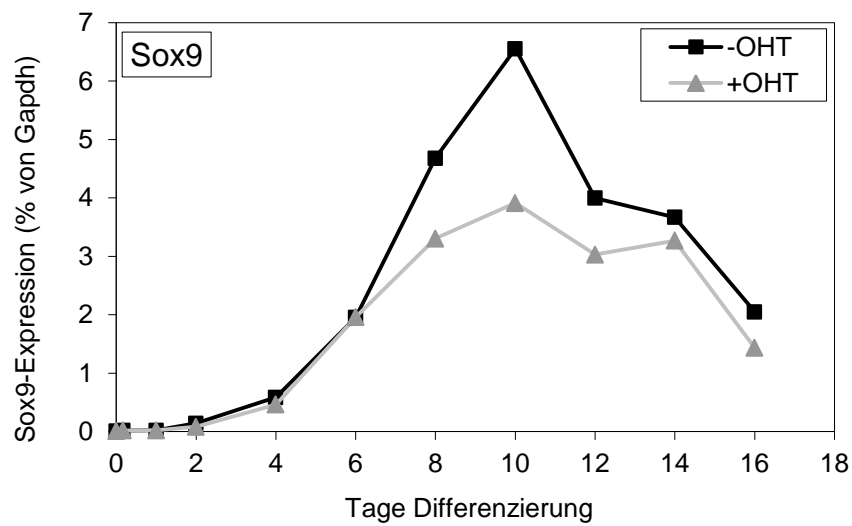
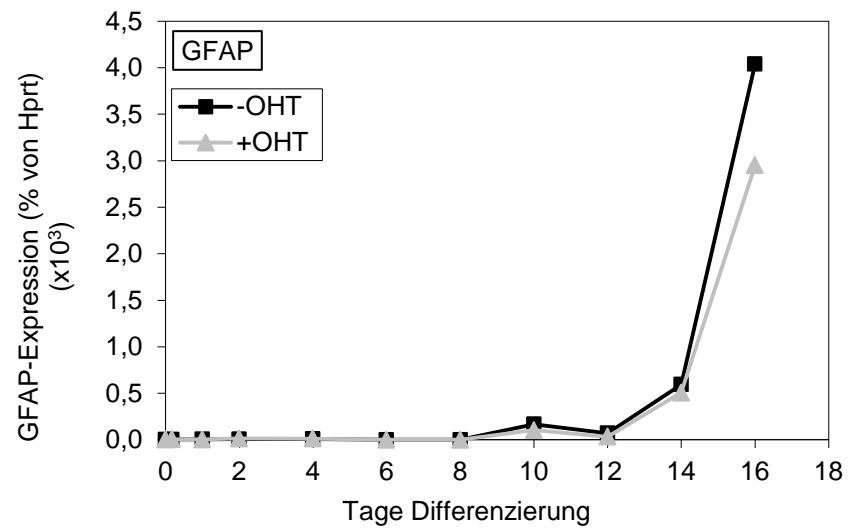
B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sieben (konstant OHT) oder drei bis fünf (2d OHT) unabhängigen Experimenten.

4.1.4 Keine Veränderung der mRNA-Expression ausgewählter Markergene verschiedener Entwicklungsstufen durch OHT in EB5-Kontrollzellen während der *in vitro* Differenzierung

Die Aktivierung von Notch1 erfolgte in allen Versuchen durch die Zugabe von OHT. Wie unter 2.7.2 beschrieben, bewirkt OHT die Loslösung des NERT-Konstruktes vom HSP90-Protein im Zytoplasma und ermöglicht somit dem Konstrukt den Eintritt in den Zellkern, in dem es dann seine Zielgene aktivieren kann. Um einen Effekt von OHT alleine auf die Zellen und ihre Differenzierung auszuschließen, wurde die neurale Differenzierung mit EB5-Kontrollzellen durchgeführt, die anstatt des NERT-Konstrukts lediglich das leere Vektorkonstrukt exprimierten. Durch die Zugabe von OHT kann Notch1 in diesen Zellen also nicht aktiviert werden. Die Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert. OHT wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum in einer Konzentration von 50 nM zugegeben. Jeden zweiten Tag wurden Proben für eine RNA-Isolierung genommen. Anschließend wurde eine Real-Time PCR Analyse durchgeführt und einige Marker, die wichtig für die neurale Differenzierung sind und deren Expression sich in EB5-Nert Zellen durch die Zugabe von OHT signifikant geändert hatte untersucht. Wie aus Abbildung 4.20 ersichtlich wird, hatte die Zugabe von OHT keinen Einfluss auf den Verlauf der Expression der Marker *Fgf5*, *Nestin*, *Sox2*, *Pax6*, *Brachyury (T)*, *Tubb3*, *GFAP*, *Sox9*, *Snai1*, *Snai2*, *Id3*. Die Abweichungen von der Expression des jeweiligen Markers ohne OHT-Zugabe entsprachen den in Zellkulturexperimenten üblichen Schwankungen. Ausreißer wie an Tag 14 der *Brachyury*-Expression können nicht zuverlässig diskutiert werden, da es sich um Einzelwerte handelt. Bei diesem Marker ist zusätzlich zu beachten, dass die Expression im Vergleich zur Expression während einer mesodermalen Differenzierung sehr gering ist (siehe 4.1.3.2). Eine Beeinflussung der Ergebnisse in EB5-Nert Zellen durch OHT alleine kann somit ausgeschlossen werden. Dies wurde für andere Fragestellungen in verschiedenen Zelllinien bereits mehrfach bestätigt (Schroeder und Just, 2000; Henning *et al.*, 2007; Meier-Stiegen *et al.*, 2010).







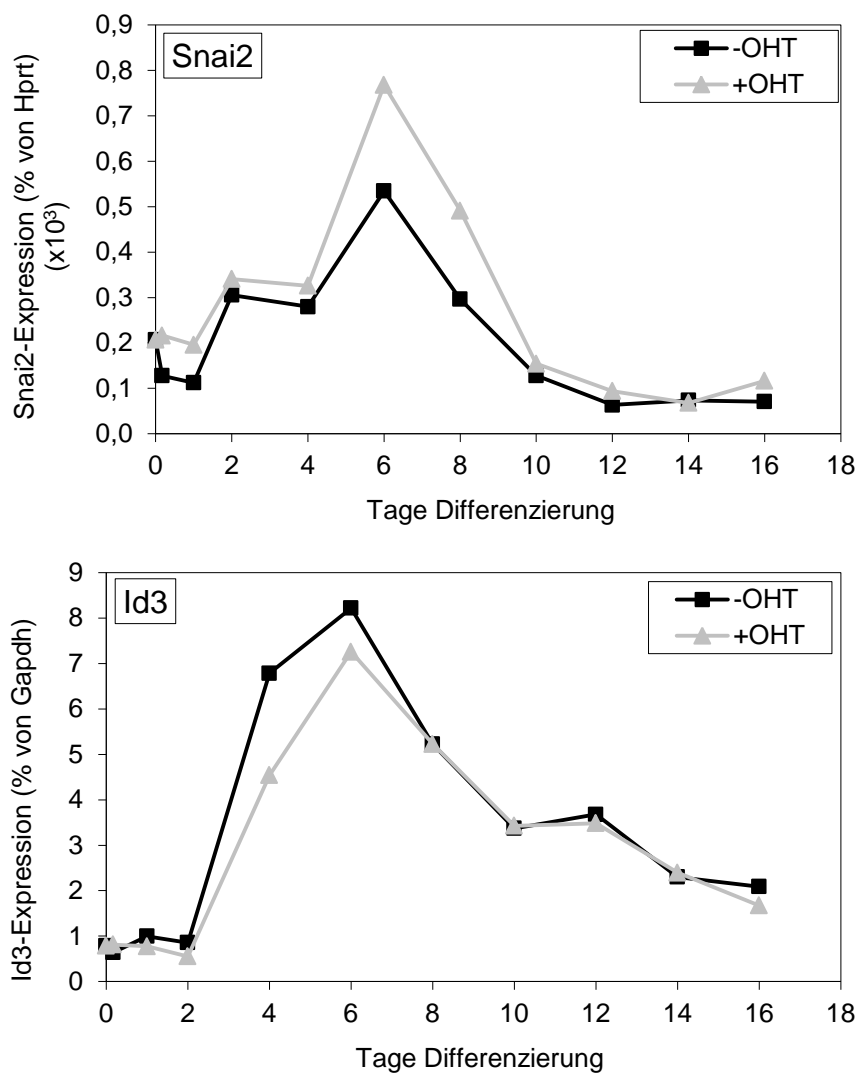


Abbildung 4.18 OHT alleine hatte keinen Einfluss auf die neurale Differenzierung EB5-Kontrollzellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die Expression ausgewählter Differenzierungsmarker mittels Real-Time PCR analysiert. OHT wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum konstant in einer Konzentration von 50 nM zugegeben. Gezeigt ist die relative Expression bezogen auf Gapdh beziehungsweise Hprt. Dargestellt sind Einzelwerte eines Experiments.

4.1.5 Förderung der Entwicklung von Gliazellen und neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen mit gleichzeitiger Inhibition von Neuronenvorläufern durch Notch1-Aktivierung

Um die während der neuronalen Differenzierung entstandenen unterschiedlichen Populationen auf zellulärer und Proteinebene näher zu betrachten, wurden Marker für embryonale und neurale Stammzellen (Sox2, Nestin), neurale Vorläuferzellen (Nestin), neuronale Vorläuferzellen (Tubb3) und Gliavorläuferzellen beziehungsweise Astrozyten (GFAP) ausgewählt. Mit Hilfe einer FACS-Analyse wurden die neural differenzierten Kulturen auf die Expression dieser Proteine untersucht. Da nicht der gesamte Differenzierungszeitraum analysiert werden konnte, wurde für die FACS-Analysen, je nach Differenzierungsverlauf, Tag 12-14 der neuronalen Differenzierung ausgewählt. An diesen Tagen konnte gleichzeitig die Zahl der neuronalen Vorläuferzellen (Tubb3-positiv) und die Zahl der Gliavorläuferzellen (GFAP-positiv) festgestellt werden, was eine Untersuchung des Einflusses von Notch1 auf die Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen ermöglichte. Außerdem war an Tag 12-14 ein Unterschied zwischen den RNA-Expressionen von *Sox2* und *Nestin* mit und ohne Notch1-Aktivierung feststellbar, was eine zusätzliche Betrachtung dieser beiden Proteine sinnvoll erscheinen ließ.

Notch1 wurde durch die Zugabe von 5 nM beziehungsweise 50 nM OHT entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder lediglich während der ersten beiden Tage der Differenzierung aktiviert.

Wie aus der Abbildung 4.19 (A,C,E und G) hervorgeht, stieg die Anzahl der Zellen, die für den Vorläuferzellenmarker Nestin positiv waren bei konstanter Aktivierung von Notch1. Bei Zugabe von 5 nM OHT war die Steigerung mit einem Faktor von 1,8 geringfügig kleiner als bei Zugabe von 50 nM OHT, was in einer Induktion mit dem Faktor 2,3 resultierte. Dies lässt die Hypothese zu, dass sich nach Aktivierung von Notch1 mehr unreife Vorläuferzellen in der Kultur befanden als ohne Aktivierung. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass Nestin direkt durch Notch1 reguliert wird. Eine Induktion dieses Markers durch eine konstante Notch1-Aktivierung könnte also auch ein direkter Notch1-Effekt sein, der nicht auf eine Zunahme von unreifen Vorläuferzellen hindeutet. In diesem Fall könnte Nestin nicht als Marker für neurale Stamm- und Vorläuferzellen verwandt werden. Die These, dass sich nach konstanter Notch1-Aktivierung mehr unreife neurale Stammzellen in den Kulturen befanden, wurde durch die ebenfalls vorhandene Induktion des Stammzellenmarkers Sox2 unter beiden Bedingungen bestätigt. Diese Induktion war allerdings nicht signifikant, wobei die geringe Probenanzahl von drei Experimenten beachtet werden muss. Hierbei sollte zusätzlich in Betracht gezogen werden, dass Sox2 auch in Gliazellen exprimiert wird und eine Zunahme der Sox2-positiven Zellen auch auf eine vermehrte Differenzierung in Gliazellen hindeuten könnte. Durch die konstante Aktivierung von Notch1

wurde die Anzahl der Zellen, die positiv für den Gliamarker GFAP waren, auf das 2,1-fache (50 nM OHT) beziehungsweise 2,3-fache (5 nM OHT) gesteigert. Gleichzeitig reduzierte sich die Anzahl der Zellen, die positiv für den Neuronenvorläufermarker Tubb3 waren um das 9-fache (50 nM OHT) beziehungsweise das 13-fache (5 nM OHT). Das bedeutet, dass die konstante Aktivierung von Notch1 die Linienentscheidung während der neuralen Differenzierung zwischen Neuronen und Gliazellen zugunsten der Gliazellen verschob. Insgesamt führte eine konstante Aktivierung von Notch1, wie erwartet, zu mehr unreifen Vorläufer- beziehungsweise Stammzellen, weniger Neuronen und mehr Gliazellen.

Durch die transiente Aktivierung von Notch1 durch die Zugabe von OHT während der ersten beiden Tage der neuralen Differenzierung erhöhte sich die Anzahl der Sox2-positiven Zellen bei einer OHT-Konzentration von 5 nM sowie 50 nM (Abb. 4.19 B,D,F und H) signifikant um jeweils das 1,4- beziehungsweise 1,3-fache. Diese leichte Induktion der Sox2-positiven Zellen ließ sich eher nach einer transienten Notch1-Aktivierung beobachten als nach einer konstanten Aktivierung. Dies stimmte mit den Untersuchungen der mRNA-Expression überein. Wenn davon ausgegangen wird, dass die *Sox2*-Expression zu diesem späten Zeitpunkt der Differenzierung auf die Expression in Gliazellen zurückzuführen ist, korreliert dieses Ergebnis zusätzlich mit der *GFAP*-mRNA-Expression zu diesem Zeitpunkt. Auch hier ist eine stärkere Induktion nach transientser Notch1-Aktivierung zu beobachten als nach konstanter Aktivierung, wobei der Unterschied hier noch eindeutiger ausfällt. Dieses Ergebnis ließ sich allerdings nur auf mRNA-Ebene und nicht auf Protein-Ebene beobachten. Dies könnte bedeuten, dass eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet oder dass das GFAP-Protein in den Zellen nach konstanter Notch1-Aktivierung geringer konzentriert vorlag, was hier nicht ausgewertet wurde, durch ein Real-Time PCR-Experiment aber sichtbar wird. Da für diesen Antikörper eine Abgrenzung von positiven und negativen Zellen während der FACS-Analyse besonders schwierig war, wäre ein anderer Grund für die Diskrepanz, dass die FACS-Analyse hierfür nicht sensitiv genug war. Die Anzahl der Nestin-positiven Zellen war nicht signifikant erhöht. Hierbei ist zu beachten, dass Nestin ein direktes Zielgen von Notch1 ist. Eine transiente Aktivierung von Notch1 führte auf mRNA-Ebene zu einer starken Induktion von *Nestin* für die ersten 12 Tage der neuralen Differenzierung. Eine direkte Induktion der *Nestin*-Expression ist in diesem Fall allerdings nur während der ersten Tage der Differenzierung möglich, da anschließend kein OHT mehr vorhanden war. Ab Tag 14 war diese Induktion im Gegensatz zur konstanten Notch1-Aktivierung allerdings nicht mehr signifikant und ab Tag 16 gar nicht mehr zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die transiente Aktivierung von Notch1 zu einer vermehrten Bildung und Erhaltung von neuralen Stamm- und Vorläuferzellen führte, dieser Effekt aber nicht so lange erhalten werden konnte wie mit einer konstanten Notch1-Aktivierung, die Zellen gegen Ende der Differenzierung also beginnen auszudifferenzieren. Für den Neuronenvorläufermarker Tubb3 ließ sich ein

Unterschied zwischen den Auswirkungen der Zugabe der beiden unterschiedlichen OHT-Konzentrationen beobachten. Während 50 nM OHT zu einer Reduktion der Tubb3-positiven Zellen um das 3,8-fache führte (Abb. 4.19 F), hatte die Zugabe von 5 nM OHT keine signifikanten Auswirkungen für Tubb3 (Abb. 4.19 H). Der durch die Aktivierung von Notch1 ausgelöste Block der neuronalen Differenzierung war hier nicht mehr erkennbar. Hierbei ist, vergleichbar mit den Real-Time PCR-Ergebnissen zu beobachten, dass die Reduktion der Tubb3-positiven Zellen nach transienter Notch1-Aktivierung nicht so groß ist wie nach konstanter Aktivierung, was darauf hindeutet, dass für eine komplette Inhibierung der Neuronenentwicklung Notch1 dauerhaft aktiviert sein muss, eine transiente Aktivierung aber bereits zu einer starken Verringerung oder Verzögerung führt.

Insgesamt reichte eine transiente Aktivierung von Notch1 während der ersten beiden Tage der Differenzierung aus, um eine Erhöhung des prozentualen Anteils von Gliazellen und unreifen neuronalen Stammzellen und nach Zugabe von 50 nM OHT, nicht aber 5 nM OHT, eine Reduktion von Neuronenvorläufern zu erreichen. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass ein erhöhter Anteil an Sox2-positiven Zellen auch auf eine vermehrte Bildung von Gliazellen hindeuten könnte anstatt auf eine Induktion von neuronalen Stammzellen.

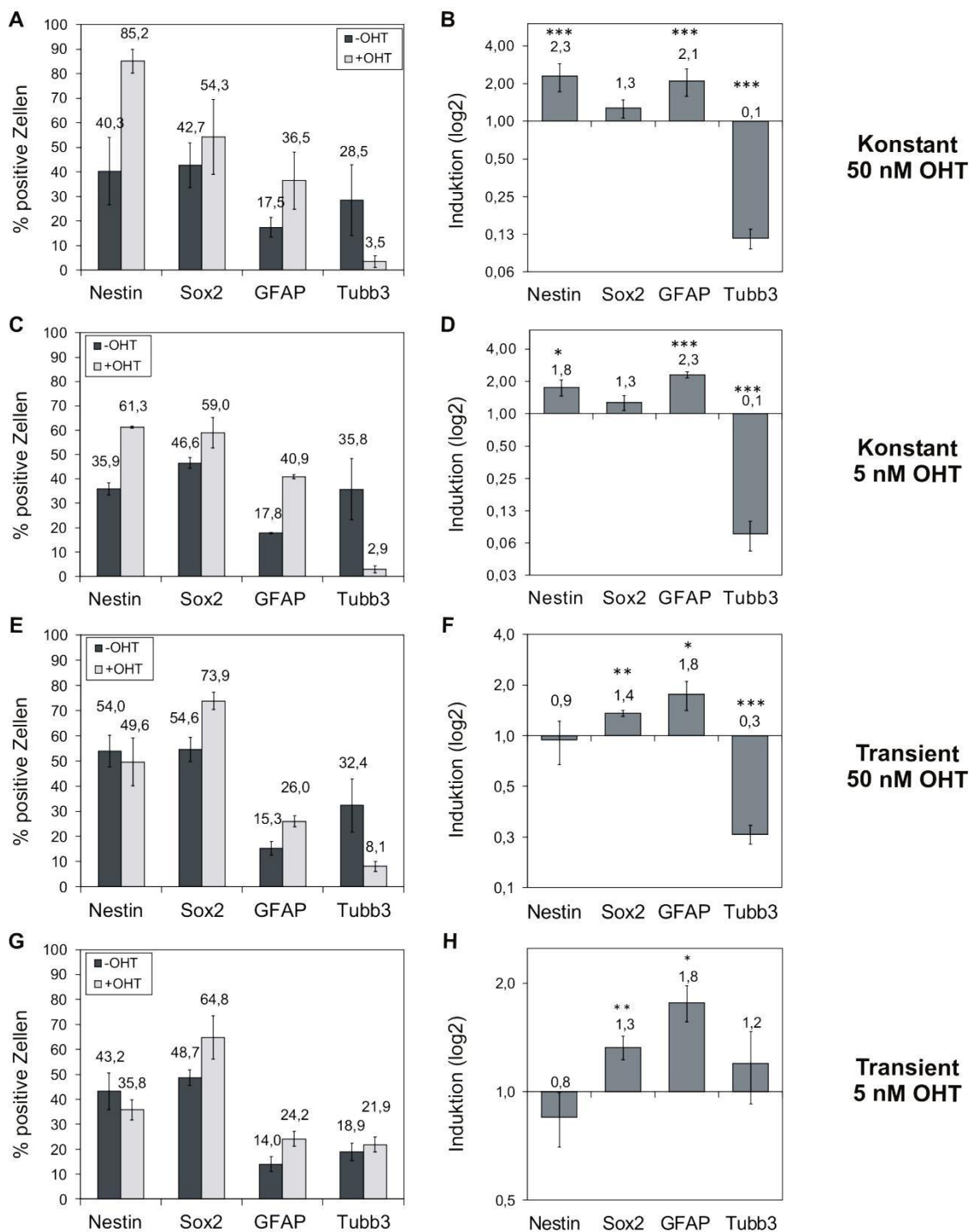


Abbildung 4.19 Notch1 förderte die Differenzierung in Glia- und neurale Vorläuferzellen und inhibierte die Differenzierung in Neuronenvorläufer EB5-Nert Zellen wurden für 12 bis 14 Tage neural differenziert. Die Anzahl der positiven Zellen wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Notch1 wurde entweder konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder transient während der ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 5 nM bzw. 50 nM OHT aktiviert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei bis sechs (50 nM OHT konstant), vier (5 nM OHT konstant), drei bis vier (50 nM OHT transient) oder fünf (5 nM transient) Experimenten.

*: $p < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A,C,E,G) Prozentuale Anzahl der für einen Populationsmarker positiven Zellen mit und ohne Aktivierung von Notch1.

B,D,F,H) Induktion der für einen Populationsmarker positiven Zellen durch die Aktivierung von Notch1.

4.2 Die Rolle von Sox9 bei den durch Notch1 vermittelten Effekten während der neuralen Differenzierung

Mit Hilfe der unter 4.1 dargestellten Experimente konnten die Effekte, die Notch1 auf die neurale *in vitro* Differenzierung hat, festgestellt werden. Sowohl die konstante als auch die transiente Aktivierung von Notch1 durch die Zugabe von OHT führte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene zu mehr GFAP-Expression, weniger Tubb3-Expression und erhöhter Expression von Nestin und Sox2. Auf RNA-Ebene konnte zusätzlich eine deutliche Erhöhung der Expression von Neuralleistenmarkern beobachtet werden.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Rolle des direkten Notch1-Zielgens *Sox9* bei Notch1-Effekten während der neuroektodermalen Differenzierung sollte nun die von Notch1 beeinflusste Linienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen und die erhöhte Expression von Neuralleistenmarkern als „Readout“ (Ausleseverfahren) dienen. Wie unter 2.7.3 beschrieben, sollte gleichzeitig mit der Aktivierung von Notch1 durch die Zugabe von OHT *Sox9* durch eine spezifische siRNA herunterreguliert werden. Anschließend sollten die durch Notch1-Aktivierung erzielten Effekte und insbesondere ihre Änderung durch das Herunterregulieren von *Sox9* ausgelesen werden. Auf diese Art und Weise kann festgestellt werden, für welche Notch1-Effekte *Sox9* eine Rolle spielt. Dafür wurde zuerst der Expressionsverlauf von *Sox9*-RNA während der neuralen Differenzierung mit und ohne Aktivierung von Notch1 verfolgt (siehe 4.2.1 und Abb. 4.13 unter 4.1.3.3). Anschließend wurde untersucht, ob *Sox9* während der neuralen Differenzierung ein direktes Zielgen von Notch1 ist (siehe 4.2.2) und die Herunterregulierung von *Sox9*-RNA und -Protein durch spezifische siRNA nachgewiesen (siehe 4.2.3). Darauf aufbauend wurde der Effekt, den ein Herunterregulieren von *Sox9* auf die durch Notch1 beeinflusste Linienentscheidung zugunsten von Gliazellen beziehungsweise die Erhöhung von Neuralleistenmarkern hat, ermittelt. Dafür wurde eine FACS-Analyse an Tag 14 der neuralen Differenzierung beziehungsweise eine Real-Time PCR Analyse während der ersten sechs Tage durchgeführt (4.2.4 und 4.2.5).

4.2.1 Induktion der *Sox9*-mRNA-Expression durch Notch1-Aktivierung

Der Verlauf der Differenzierung mit und ohne Notch-Aktivierung wurde mittels Real-Time PCR verfolgt und es wurde über einen Zeitraum von 12 bis 16 Tagen ein RNA-Profil der *Sox9*-Expression erstellt. Sowohl eine transiente Notch1-Aktivierung während der ersten beiden Tage der neuralen Differenzierung als auch eine dauerhafte Aktivierung bewirkten einen starken Anstieg der *Sox9*-Expression in den ersten sechs Tagen und am Ende der Differenzierung (siehe Abb. 4.13 unter 4.1.3.3). *Sox9* wird sowohl in neuralen Stammzellen, als auch in Gliavorläufern als auch in Neuralleistenzellen exprimiert. Eine erhöhte Expression von *Sox9* deutet also darauf

hin, dass die Zellen entweder als unreife neurale Stammzellen erhalten wurden, dass sie anfangen in Richtung Gliavorläufer zu differenzieren oder dass sie sich zu Neuralleistenzellen entwickeln. Für Abbildung 4.20 wurden EB5-Nert Zellen für 16 Tage neural differenziert. Vier Stunden vor der RNA-Ernte der jeweiligen Probe wurde Notch1 durch die Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. Direkt anschließend wurde die RNA geerntet und eine Real-Time PCR Analyse durchgeführt. „4h“ steht für eine vierstündige OHT-Induktion von embryonalen Stammzellen in neuralen Differenzierungsmedium, während „0“ in Abbildung 4.20 B bedeutet, dass zu embryonalen Stammzellen in Erhaltungsmedium für 4 Stunden OHT zugegeben wurde. Unter diesen Bedingungen lag die *Sox9*-Expression nach Notch1-Aktivierung stets über der Expression ohne Notch1-Aktivierung, die *Sox9*-Expression konnte also an jedem Tag der Differenzierung neu durch die Zugabe von OHT induziert werden. Das bedeutet, dass *Sox9* auch zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung ein Zielgen von Notch1 ist.

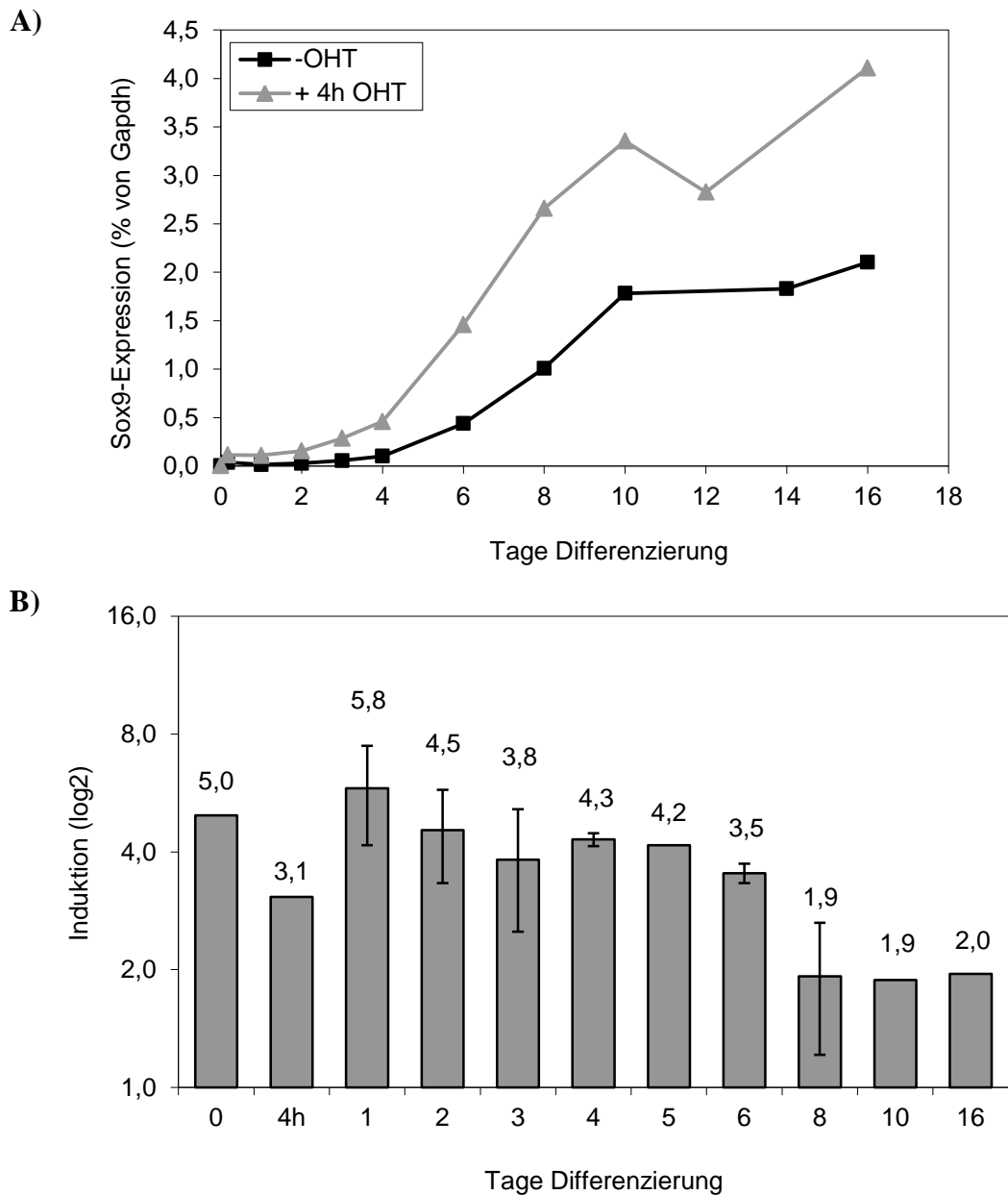


Abbildung 4.20 Die Sox9-mRNA-Expression wurde durch Notch1-Aktivierung induziert
 EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die Sox9-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde jeden Tag für vier Stunden durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert.

A) Relative Expression bezogen auf Gapdh Dargestellt sind Einzelwerte eines Experiments. Das Experiment wurde einmal (undifferenzierte Zellen mit OHT, 4 Stunden, Tag 5, 7 und 10 bis 16) oder zweimal (undifferenzierte Zellen ohne OHT, Tag 1 bis 4, 6 und 8) durchgeführt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind Einzelwerte (undifferenzierte Zellen, 4 Stunden, Tag 5, 7, 10 und 16) oder der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei Experimenten (Tag 1 bis 4, 6 und 8).

4.2.2 Induktion von *Sox9* während der frühen neuralen Differenzierung durch Notch1-Aktivierung in Abwesenheit von Proteinsynthese

Die Zugabe von Cycloheximid zu lebenden Zellen führt zur Blockierung der Proteinbiosynthese. Es ist bereits bekannt, dass *Sox9* in embryonalen Stammzellen ein direktes Zielgen von Notch1 ist (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Um dieses Ergebnis zu bestätigen und zusätzlich festzustellen, ob *Sox9* auch am Anfang der neuralen Differenzierung ein direktes Zielgen von Notch1 ist, wurden 50 µg/ml Cycloheximid zu undifferenzierten EB5-Nert Zellen und zu EB5-Nert Zellen, die für einen Tag neural differenziert worden waren, gegeben. 30 Minuten später wurde Notch1 durch die Zugabe von 50 nM OHT für 4 Stunden aktiviert. Auf diese Art und Weise war es möglich, die RNA-Expression von direkten Notch1-Zielgenen zu aktivieren, jedoch deren Proteinbiosynthese zu inhibieren. Dadurch konnte die Transkription indirekter Zielgene, deren Expression über die Proteinprodukte der direkten Zielgene aktiviert, wird nicht durch Notch1 reguliert werden. Aus Abbildung 4.21 geht hervor, dass die *Sox9*-Expression sowohl in undifferenzierten embryonalen Stammzellen als auch in Zellen, die für einen Tag neural differenziert worden waren durch die Zugabe von OHT steigt. Die Induktion war dabei 8,0- und 5,9-fach. Auch nach Zugabe von Cycloheximid war dieser durch OHT verursachte Anstieg vorhanden. Die Induktionen veränderten sich zu 4,1- und 5,6-fach. Daraus kann geschlossen werden, dass *Sox9* in beiden Differenzierungsstadien ein direktes Zielgen von Notch1 ist. Die Zugabe von Cycloheximid alleine bewirkte einen 1,9-fachen bis 3,7-fachen Anstieg der Expression, was wahrscheinlich durch den Wegfall von reprimierenden Faktoren verursacht wurde.

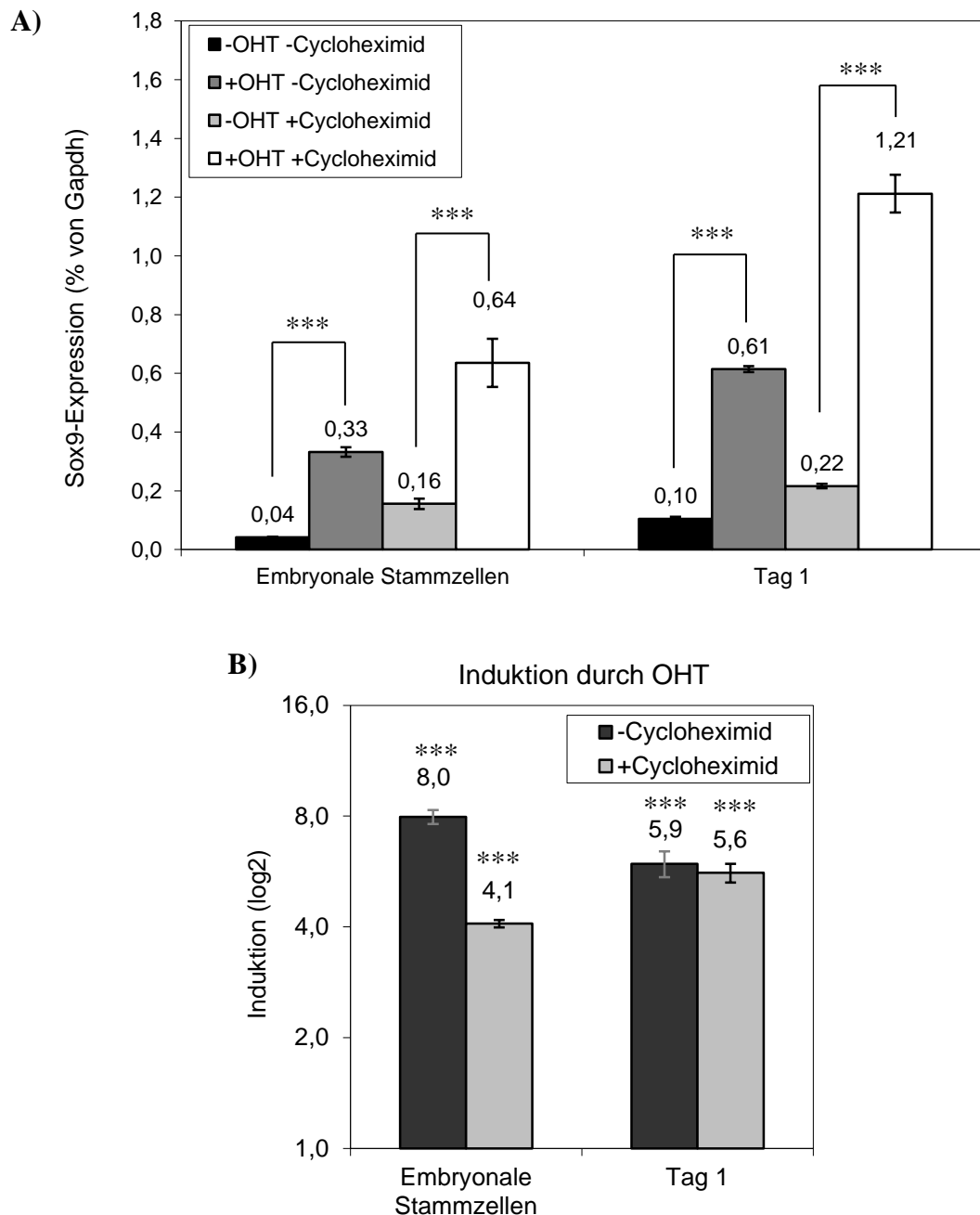


Abbildung 4.21 Sox9 ist ein direktes Notch1-Zielgen Zu undifferenzierten oder für einen Tag neural differenzierten EB5-Nert Zellen wurden 50 µg/ml Cycloheximid zugegeben. Die Aktivierung von Notch1 erfolgte 30 Minuten später durch die Zugabe von 50 nM OHT. Die RNA-Isolierung erfolgte 4 Stunden später. Anschließend wurde eine Real-Time PCR durchgeführt und die *Sox9*-Expression auf Gapdh normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten.

***: $p < 0,005$

A) Relative Expression von Sox9 mit und ohne Notch1-Aktivierung beziehungsweise Cycloheximid Die *Sox9*-Expression steigt durch OHT sowohl mit als auch ohne Cycloheximid zu beiden Zeitpunkten.

B) Induktion der Expression von Sox9 durch Notch1-Aktivierung Die Induktion durch OHT ist an beiden Tagen mit und ohne Cycloheximid deutlich positiv.

4.2.3 Herunterregulierung von *Sox9*-mRNA als auch *Sox9*-Protein durch *Sox9*-siRNA

Um den Einfluss zu untersuchen, den das direkte Notch1-Zielgen *Sox9* auf die durch Notch1 ausgelösten Effekte während der neuralen Differenzierung hat, wurde *Sox9* mittels siRNA herunterreguliert. Es sollte die Rolle von *Sox9* während der sehr frühen neuralen Differenzierung näher betrachtet werden. Da *Sox9* bereits in embryonalen Stammzellen direkt durch die Aktivierung von Notch1 induziert wird, wurde dieser Zeitpunkt, also Tag 0 der Differenzierung, für den Einsatz der *Sox9*-spezifischen siRNA ausgewählt. Gleichzeitig mit der Zugabe von 100 nM *Sox9*-siRNA wurde OHT in einer Konzentration von 50 nM zugesetzt und die neurale Differenzierung durch das neurale Differenzierungsmedium N2B27 induziert. In allen Ansätzen war das Transfektionsreagenz vorhanden. 24 Stunden später wurden Proben für eine RNA-Isolierung genommen und anschließend eine Real-Time PCR Analyse durchgeführt, um den Grad der Herunterregulierung von *Sox9* zu bestimmen. Abbildung 4.22 zeigt eine Erhöhung der *Sox9*-Expression durch OHT um das 12-fache von 0,08 % GAPDH-Expression auf 0,99 % GAPDH-Expression. Durch die Zugabe von *Sox9*-siRNA ließ sich diese Induktion auf das Dreifache der Expression ohne OHT reduzieren. Damit wird nicht, wie gewünscht, die exakte Expression ohne Notch1-Aktivierung erreicht, was bedeutet, dass auch, wenn *Sox9* durch siRNA herunterreguliert wird, immer noch eine leichte Aktivierung durch Notch1 erfolgt. Es findet jedoch eine deutliche Reduktion der *Sox9*-Expression statt, sodass bei folgenden Experimenten eine Verringerung der durch *Sox9* ausgelösten Effekte erwartet werden kann.

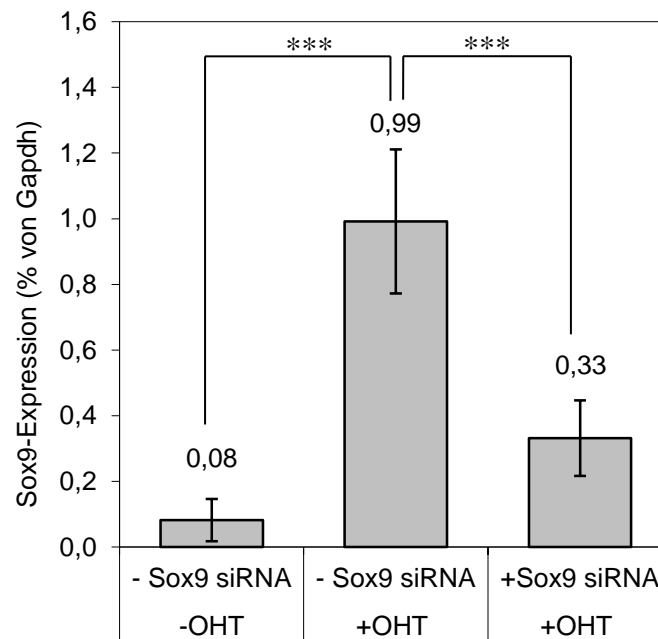


Abbildung 4.22 *Sox9*-siRNA regulierte *Sox9*-mRNA-Expression herunter

Bei EB5-Nert Zellen wurde gleichzeitig die neurale Differenzierung induziert, 50 nM OHT und 100 nM *Sox9*-siRNA zugegeben. Nach 24 Stunden wurde RNA geerntet und eine Real-Time PCR durchgeführt. Die *Sox9*-Expression wurde auf Gapdh normalisiert. Die Induktion durch OHT wurde durch die siRNA zum Teil wieder abgefangen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von sechs Experimenten. ***: $p < 0,005$

Um eine Herunterregulierung nicht nur der *Sox9*-RNA sondern auch des Proteins nachzuweisen, wurde eine Proteinisolierung zwei Tage nach der Induktion der Differenzierung und der Zugabe von 100 nM *Sox9*-siRNA und 50 nM OHT durchgeführt. Auch hier war in allen Ansätzen das Transfektionsreagenz vorhanden. Anschließend wurden die Proben mittels Western-Blot analysiert. Aus Abbildung 4.23 geht hervor, dass auch auf Proteinebene eine deutliche Induktion von Sox9 durch die Aktivierung von Notch1 erfolgte. Durch den Einsatz von *Sox9*-siRNA wurde diese Induktion rückgängig gemacht. Die Herunterregulierung des Sox9-Proteins wirkte sich deutlicher aus als auf RNA-Ebene, was die Aussagefähigkeit der Experimente zur Untersuchung der Rolle von Sox9 auf die durch Notch1 induzierten Effekte während der neuralen Differenzierung verstärkt. Auch die Herunterregulierung von *Sox9* ohne die Zugabe von OHT resultierte in einer deutlichen Reduktion der Sox9-Proteinmenge.

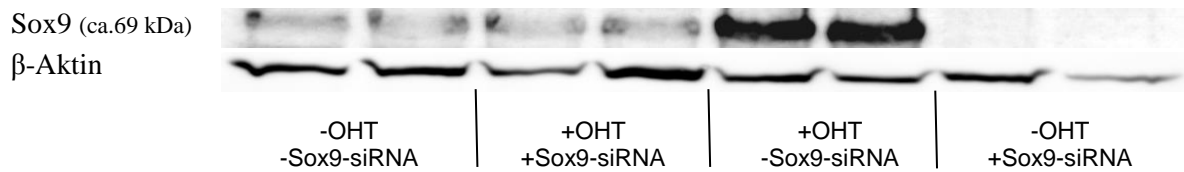


Abbildung 4.23 Sox9-siRNA regulierte die Sox9-Proteinexpression erfolgreich herunter

Bei EB5-Nert Zellen wurde gleichzeitig die neurale Differenzierung induziert, 50 nM OHT und 100 nM *Sox9*-siRNA zugegeben. Nach 2 Tagen wurden Proteine geerntet und ein Western Blot durchgeführt. Die Induktion durch OHT wurde durch die siRNA wieder abgefangen. Dargestellt sind Doppelwerte eines Experiments. Das Experiment wurde insgesamt dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Um zu untersuchen, wie lange der Effekt der *Sox9*-Herunterregulierung während der neuronalen Differenzierung anhält, wurde die *Sox9*-Expression in den ersten sechs Tagen der Differenzierung nach zweitägiger Notch1-Aktivierung und Herunterregulierung der *Sox9*-mRNA zu Beginn der Differenzierung betrachtet (siehe Abb. 4.24). Es war eine deutliche Induktion der *Sox9*-Expression während des gesamten Untersuchungszeitraums durch die transiente Notch1-Aktivierung erkennbar. Ebenfalls wurde deutlich, dass die Zugabe der *Sox9*-siRNA eine Herunterregulierung der *Sox9*-Expression bis zum Tag 5 der Differenzierung hervorrief. Das bedeutet, dass *Sox9* nicht nur in embryonalen Stammzellen sondern auch in den darauffolgenden Stadien der frühen neuronalen Differenzierung herunterreguliert wurde und somit auch Effekte, die Zellpopulationen dieser frühen Stadien betreffen in den folgenden Experimenten untersucht wurden. Die Reduktion der *Sox9*-Expression erreichte allerdings nicht vollständig die Expression ohne Notch1-Aktivierung. Trotzdem ist zu erwarten, dass eine Änderung der Notch1-Effekte sichtbar wird, wenn diese durch *Sox9* reguliert werden.

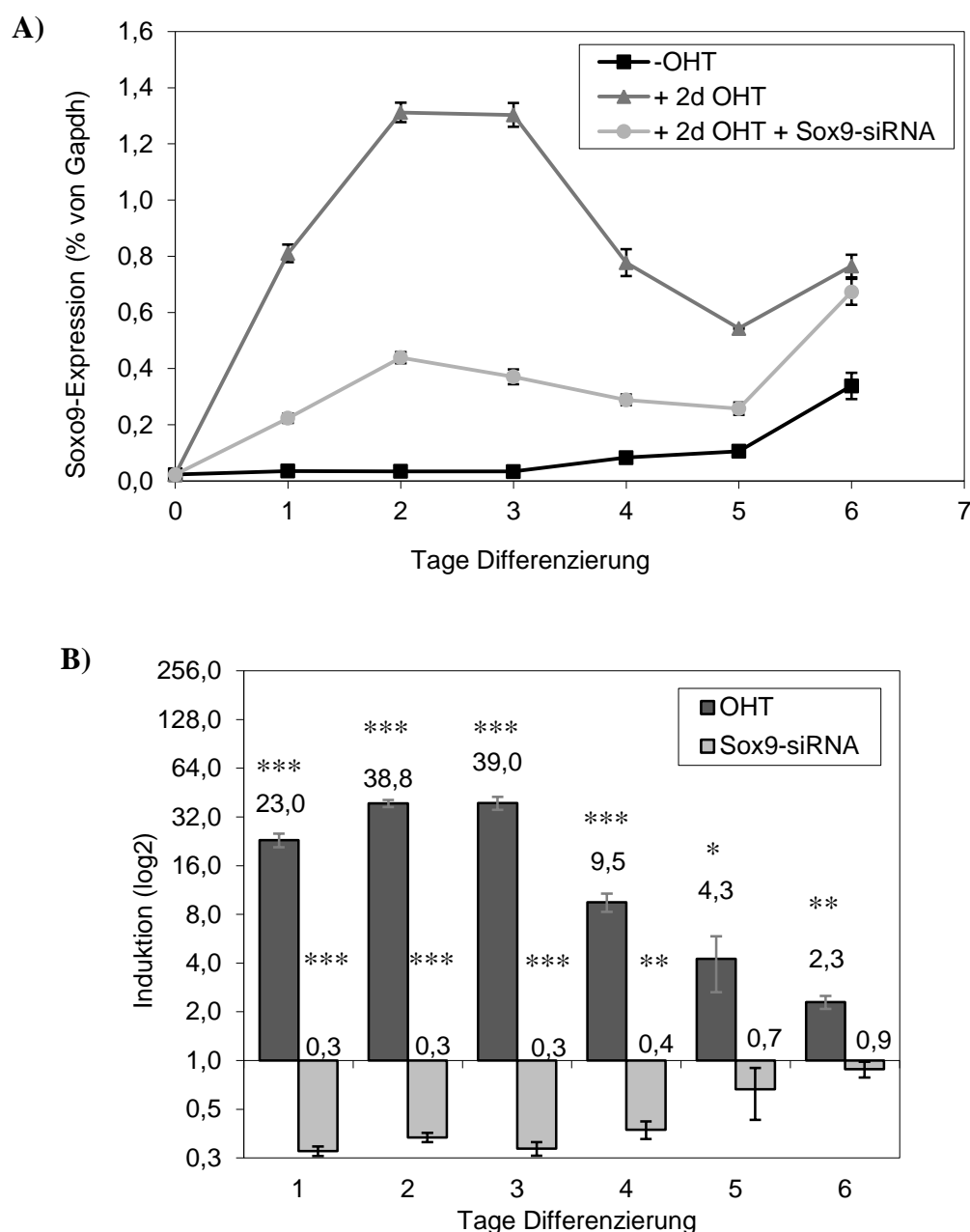


Abbildung 4.24 Zugabe von Sox9-siRNA beim Start der Differenzierung bewirkte eine Reduktion der Sox9-mRNA-Expression für fünf Tage EB5-Nert Zellen wurden für 6 Tage neural differenziert. Notch1 wurde für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. Die Herunterregulierung von Sox9 erfolgte durch die zusätzliche Zugabe von 100 nM Sox9-siRNA beim Start der Differenzierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression von Sox9 bezogen auf Gapdh

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung und durch Sox9-siRNA Dunkle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe -OHT (schwarz) aus A); helle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT+Sox9-siRNA (hellgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) aus A)

4.2.4 Vermittlung der Notch1-induzierten Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen durch *Sox9*

Wie unter 4.1. gezeigt, bewirkte eine Aktivierung von Notch1 eine vermehrte Bildung von Zellen mit Stammzell- oder Vorläufercharakter (*Sox2*- und *Nestin*-positiv) sowie von Gliazellen (*GFAP*-positiv) und eine Reduktion der Neuronenvorläuferzellen (*Tubb3*-positiv). Es ist ebenfalls bekannt, dass *Sox9* die Bildung von Gliazellen begünstigt und eine inhibierende Wirkung auf die Differenzierung in Neuronen hat. Die Frage ist nun, ob der Einfluss von Notch1 auf die Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen durch das direkte Notch1-Zielgen *Sox9* reguliert wird. Dazu wurden EB5-Nert Zellen für 12 bis 14 Tage neural differenziert und anschließend mittels FACS-Analyse die Anzahl der für die Marker *Nestin*, *Sox2*, *GFAP* und *Tubb3* positiven Zellen untersucht. Notch1 wurde dabei konstant über den gesamten Zeitraum der Differenzierung oder lediglich während der ersten beiden Tage durch die Zugabe von 5 beziehungsweise 50 nM OHT aktiviert. *Sox9* wurde durch die Zugabe von 100 nM *Sox9*-siRNA beim Start der Differenzierung herunterreguliert.

Aus der Abbildung 4.25 geht hervor, dass die Herunterregulierung von *Sox9* unter keiner der vier Bedingungen einen Einfluss auf die Anzahl der *Sox2*-positiven Zellen hatte. Der beobachtete Anstieg der *Sox2*-positiven Zellen durch die Aktivierung von Notch1 war nur nach transientser Notch1-Aktivierung signifikant, aber in den FACS-Experimenten sehr gering. Die Induktion lag bei ca. 1,3, während sie auf mRNA-Ebene zwischen 4 und 5 lag. Daher ist ein möglicher Effekt der *Sox9*-Herunterregulierung in FACS-Experimenten wahrscheinlich sehr schlecht zu beobachten und eine Untersuchung auf RNA-Ebene zu diesem späten Zeitpunkt hat nicht stattgefunden. Ein weiteres Problem für *Sox2* ist, dass dieser Marker sowohl in neuronalen Stammzellen als auch in Gliazellen exprimiert wird und eine Förderung der Gliazelldifferenzierung durch *Sox9* wahrscheinlich auf Kosten der neuronalen Stammzellen gehen würde. Dies würde dazu führen, dass es mehr *Sox2*-positive Gliazellen und dafür weniger *Sox2*-positive neurale Stammzellen geben würde, was sich möglicherweise ausgleichen könnte. Hier wäre eine Doppelfärbung mit anderen Markern wie zum Beispiel *GFAP* nötig, um eine Aussage treffen zu können.

Für *Nestin* ließ sich lediglich nach der konstanten Zugabe von 5 nM OHT ein leichter, 1,2-facher Anstieg der positiven Zellen beobachten. Da nach transientser Aktivierung von Notch1 kein Effekt auf die *Nestin*-positiven Zellen erkennbar war, war hier auch keine Reversion durch eine *Sox9*-Herunterregulierung möglich. Da *Nestin* ein direktes Zielgen von Notch1 ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der nach konstanter Aktivierung beobachtete Anstieg des Anteils der *Nestin*-positiven Zellen auf eine direkte Aktivierung durch Notch1 zurückzuführen ist und damit vermutlich nicht über *Sox9* reguliert wird. Da seine RNA-Expression aber noch viele Tage nach der transienten Aktivierung auf hohem Niveau anhält, kann es zu diesen Zeitpunkten vermutlich

als Marker für neurale Stamm- und Vorläuferzellen angesehen werden. Die Analyse des Einflusses von Sox9 fand allerdings zu einem so späten Zeitpunkt der Differenzierung statt, dass eine Zunahme der Nestin-positiven Zellen nach transienter Notch1-Aktivierung nicht mehr vorhanden und damit auch nicht mehr revertiert werden konnte. Die beobachtete Zunahme durch die Herunterregulierung von *Sox9* nach konstanter Notch1-Aktivierung mit 5 nM OHT könnte darauf beruhen, dass Sox9 an einer Differenzierung der neuronalen Zellen in Gliazellen mitwirkt und seine Herunterregulierung möglicherweise zu einer verzögerten Gliazelldifferenzierung und somit zu mehr unreifen Vorläuferzellen führt. Dass sich dies nicht auf die Differenzierung mit konstanter Notch1-Aktivierung durch 50 nM OHT auswirkte, lässt sich damit erklären, dass hier der Anteil an Nestin-positiven Zellen bei über 85% liegt und es somit schwerer wird eine weitere Erhöhung durch das zeitweise Ausschalten der Expression eines Faktors hervorzurufen. Dass sich diese Aufhebung der möglicherweise durch Sox9 bewirkten Gliadifferenzierungsverzögerung nicht für Sox2 beobachten ließ, könnte daran liegen, dass Sox2 sowohl in neuronalen Stammzellen als auch in Gliazellen exprimiert wird und sich diese beiden Stadien während der Differenzierung überlappen. Für Nestin und Sox2 ist zusätzlich zu beachten, dass späte Tage der Differenzierung analysiert wurden und ein weiterer oder abweichender Einfluss auf diesen Notch1-Effekt möglicherweise früher in der Differenzierung sichtbar geworden wäre. Ein Effekt von Sox9 auf die Erhaltung von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen konnte somit nicht nachgewiesen, aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Die Linienentscheidung Richtung Glia wurde unter allen vier Bedingungen durch die Aktivierung von Notch1 begünstigt (Abb. 4.19). Durch die Zugabe von *Sox9*-siRNA wurde ebenfalls unter allen vier Bedingungen eine Reversion dieses Notch1-Effektes erreicht, die allerdings nach einer zweitägigen Notch1-Aktivierung durch 50 nM OHT nicht signifikant war. Diese Reversion ist keine vollständige Reversion. Hier könnte sich möglicherweise die nicht vollständige Herunterregulierung der *Sox9*-mRNA bemerkbar machen (siehe 4.2.3). Die Reversion deutet auf einen Einfluss von Sox9 auf die durch Notch1 induzierte Förderung der Gliazelldifferenzierung hin.

Die Inhibierung der Neuronendifferenzierung durch Notch1 war in den Abbildung 4.25 deutlich zu erkennen. Lediglich nach einer Notch1-Aktivierung für zwei Tage durch Zugabe von 5 nM OHT ließ sich dieser Block nicht mehr beobachten (Abb. 4.25 D). Durch Zugabe von *Sox9*-siRNA ergab sich nach zweitägiger Notch1-Aktivierung durch 50 nM OHT und nach konstanter Notch1-Aktivierung durch 5 nM OHT eine signifikante 1,5-fache beziehungsweise nicht signifikante 1,2-fache Reversion der Tubb3-positiven Zellen. Die konstante Aktivierung durch 50 nM OHT ergab keine Reversion. Eine konstante Zugabe von OHT scheint auch einen konstanten Block der Neuronendifferenzierung zu bewirken, der durch die Wegnahme von *Sox9* am Anfang der Differenzierung durch *Sox9*-siRNA nicht aufgehoben werden kann. Eine nur

transiente Notch1-Aktivierung am Anfang der Differenzierung dagegen ist nur bei einer höheren OHT-Konzentration von 50 nM dazu in der Lage, einen Block der Neuronendifferenzierung zu erreichen. Dieser Block allerdings kann durch das gleichzeitige Herunterregulieren von *Sox9* leicht revertiert werden.

Dies deutet darauf hin, dass Notch1 bereits am Anfang der Differenzierung Einfluss auf die Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen nimmt. Die Förderung der Gliazelldifferenzierung und zum größten Teil auch die Inhibierung der neuronalen Differenzierung wird bereits durch eine Notch1-Aktivierung in den ersten beiden Tagen der Differenzierung erreicht. *Sox9* scheint ebenfalls zu diesem frühen Zeitpunkt bereits maßgeblich an der Förderung der Gliazelldifferenzierung beteiligt zu sein, da seine Herunterregulierung unter allen vier Bedingungen eine Reversion dieser Förderung bewirkt. Um die Differenzierung in Neuronen zu blockieren, muss Notch1 konstant aktiviert werden oder seine Aktivierung in den ersten beiden Tagen muss durch die höhere OHT-Konzentration induziert worden sein. Nur in diesem Fall ist durch eine Herunterregulierung von *Sox9* eine leichte Reversion dieses Blocks zu erreichen. Dies bedeutet, dass Notch1 am Anfang der Differenzierung ebenfalls einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung hat. Ob *Sox9* allerdings maßgeblich daran beteiligt ist, konnte nicht geklärt werden. Durch eine aktive Förderung der Gliazelldifferenzierung durch *Sox9* wird möglicherweise die Neuronendifferenzierung behindert. Es ist bekannt, dass die konditionale Deletion von *Sox9* im Rückenmark der Maus zu einer Reduktion von spezifizierten Oligodendrozyten und Astrozyten und zur gleichzeitigen Überproduktion von Motoneuronen und V2-Interneuronen, was darauf schließen lässt, dass *Sox9* wie Notch am „Switch“ von der Differenzierung von neuralen Stammzellen in Neuronen zu ihrer Differenzierung in Gliazellen maßgeblich beteiligt ist (Stolt *et al.*, 2003). Eine Möglichkeit ist daher, dass durch eine aktive Förderung der Gliazelldifferenzierung durch *Sox9* möglicherweise die Neuronendifferenzierung behindert und damit verringert wird, dieser Effekt aber indirekt und schwächer und damit mit den hier verwandten Methoden nicht oder zumindest schwerer nachweisbar ist.

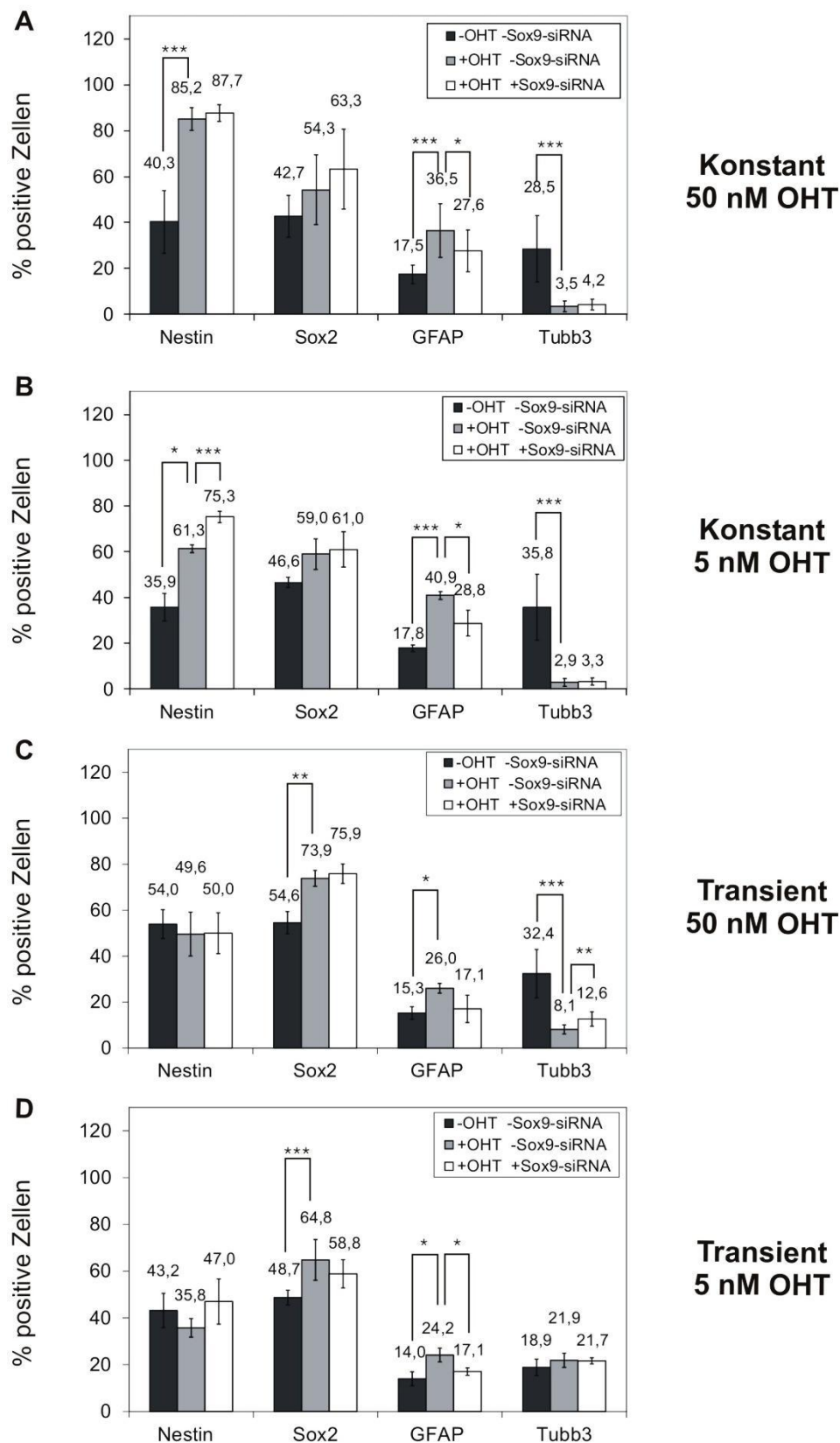


Abbildung 4.25 Die Herunterregulierung von *Sox9* bewirkte eine Reversion der Notch1 induzierten Förderung der Differenzierung in Gliazellen EB5-Nert Zellen wurden 12 bis 14 Tage neural differenziert und mittels FACS-Analyse untersucht. 50 nM bzw. 5 nM OHT wurden konstant oder transient während der ersten beiden Tage der Differenzierung zugegeben. 100 nM *Sox9*-siRNA wurden zum Start der Differenzierung zusätzlich zugegeben. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei bis sechs Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

4.2.5 Kein offensichtlicher Einfluss auf die Notch1 induzierte Differenzierung in Neuralleistenzellen durch *Sox9*

Neben dem Einfluss von Notch1 auf die Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Notch1 zu einer erhöhten Expression von Neuralleistemarkern führt (siehe 4.1.3.4). Da *Sox9* eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Neuralleiste spielt, lag die Vermutung nahe, dass Notch1 die Induktion der Expression der Neuralleistemarkers über die Induktion des direkten Zielgens *Sox9* hervorruft. Daher wurde die bereits verwandte siRNA-Strategie auch eingesetzt, um die Rolle von *Sox9* für die Neuralleistendifferenzierung zu untersuchen. Dazu wurden EB5-Nert Zellen für sechs Tage neural differenziert und jeden Tag eine RNA-Probe genommen. Anschließend wurde eine Real-Time PCR Analyse durchgeführt. Notch1 wurde für die ersten beiden Tage der Differenzierung durch die Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. Die *Sox9*-siRNA wurde beim Start der Differenzierung in einer Konzentration von 100 nM zusätzlich zu OHT zugegeben. Die Abbildungen 4.33 bis 4.38 zeigen die Expression eines Markers von Tag 0 bis Tag 6 (jeweils **A**) und die Induktion durch OHT (jeweils **B**) dunkle Balken). Die Induktion beziehungsweise die Reduktion der Expression, die durch den zusätzlich zur Notch1-Aktivierung durchgeführten Einsatz von *Sox9*-siRNA hervorgerufen wurde, ist jeweils unter **B**) durch die hellen Balken dargestellt. Wie bereits in Abbildung 4.24 unter 4.2.3 dargestellt, war eine deutliche Induktion der *Sox9*-Expression während des gesamten Untersuchungszeitraums durch die Notch1-Aktivierung erkennbar. Ebenfalls wurde deutlich, dass die Zugabe der *Sox9*-siRNA eine Herunterregulierung der *Sox9*-Expression bis zum Tag 5 der Differenzierung hervorrief. Die Abbildungen 4.26 bis 4.29 zeigen die Expressionen der Neuralleistemarkers *Snai1*, *Snai2*, *Id3* und *Foxd3*. *Snai1*, *Snai2* und *Id3* wurden deutlich stärker exprimiert nachdem Notch1 aktiviert wurde. Diese Induktion wurde lediglich im Fall von *Id3* durch die Herunterregulierung von *Sox9* an den Tagen 4 und 6 signifikant leicht verringert (Abb. 4.28). Es ist möglich, dass dies einen Effekt von *Sox9* auf die Neuralleistendifferenzierung darstellt. Da *Id3* allerdings auch in neuralen Stammzellen des zentralen Nervensystems exprimiert wird und an deren Erhaltung mitwirkt (Jen *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010), besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass *Sox9* daran beteiligt ist neurale Stammzellen zu erhalten oder herzustellen und seine Herunterregulierung daher zu einer verringerten Expression von *Id3* als neuralen Stammzellmarker führt. Die geringe Reversion könnte darauf hindeuten, dass nur eine Subpopulation der *Id3*-exprimierenden Zellen auf die *Sox9*-Herunterregulierung reagiert oder ein Ergebnis der nicht vollständigen *Sox9*-Herunterregulierung sein. Wie unter 4.1.3.4 bereits dargestellt, wurde die Expression von *Foxd3* während der ersten Tage der neuralen Differenzierung durch die Notch1-Aktivierung reduziert.

Dies konnte erneut bestätigt werden. Diese Reduktion konnte durch die Zugabe von *Sox9*-siRNA nur an Tag 1 und 2 signifikant revertiert werden. Diese Reversion fiel allerdings sehr gering aus und erreichte in keinem Fall auch nur annähernd die Expression ohne Notch1-Aktivierung. Bei einer Wirkung der *Sox9*-Herunterregulierung zu diesem Zeitpunkt muss davon ausgegangen werden, dass es sich um einen Effekt in embryonalen Stammzellen, die am Anfang der Differenzierung noch in geringen Mengen vorhanden sein sollten und die *Foxd3* exprimieren, handelte. Die Induktion von *Sox9* durch Notch1 würde in diesem Fall dazu führen, dass embryonale Stammzellen schneller ausdifferenzieren, was dadurch sichtbar wird, dass die Herunterregulierung von *Sox9* in geringfügig mehr embryonalen Stammzellen resultierte. Da der beobachtete Effekt hier sehr klein war, muss davon ausgegangen werden, dass *Sox9* hier nicht alleine an der Regulation beteiligt ist. Die in vorangegangenen Experimenten beobachtete Induktion der *Foxd3*-Expression (siehe 4.1.3) ab Tag 4 bis 6 der Differenzierung konnte hier nicht beobachtet werden. Hier wird die unterschiedliche Zeitkinetik der Experimente sichtbar. Die Induktion von *Foxd3* würde wahrscheinlich anschließend an Tag 6 erfolgen. Somit konnte hier nicht untersucht werden, ob *Sox9* hier seinen Einfluss auf die Neuralleistendifferenzierung erkennen lässt.

Insgesamt konnte eine entscheidende Rolle von *Sox9* auf die durch Notch1 induzierte vermehrte Expression von Neuralleistenmarkern nicht nachgewiesen werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass das Ausschalten oder Herunterregulieren eines einzigen Gens wie *Sox9* durch Redundanzen anderer Faktoren ausgeglichen werden könnte. Es ist zum Beispiel bekannt, dass *Sox8*, *Sox9* und *Sox10* teilweise die Funktionen füreinander übernehmen können (Kelsh, 2006; Haldin und LaBonne, 2010; Stolt und Wegner, 2010). *Sox8* ersetzt *Sox9* teilweise bei der Spezifizierung von Gliazellen (Stolt *et al.*, 2005) und sowohl *Sox9* als auch *Sox8* kompensieren den Verlust von *Sox10* in Oligodendrozytenvorläuferzellen (Finzsch *et al.*, 2008).

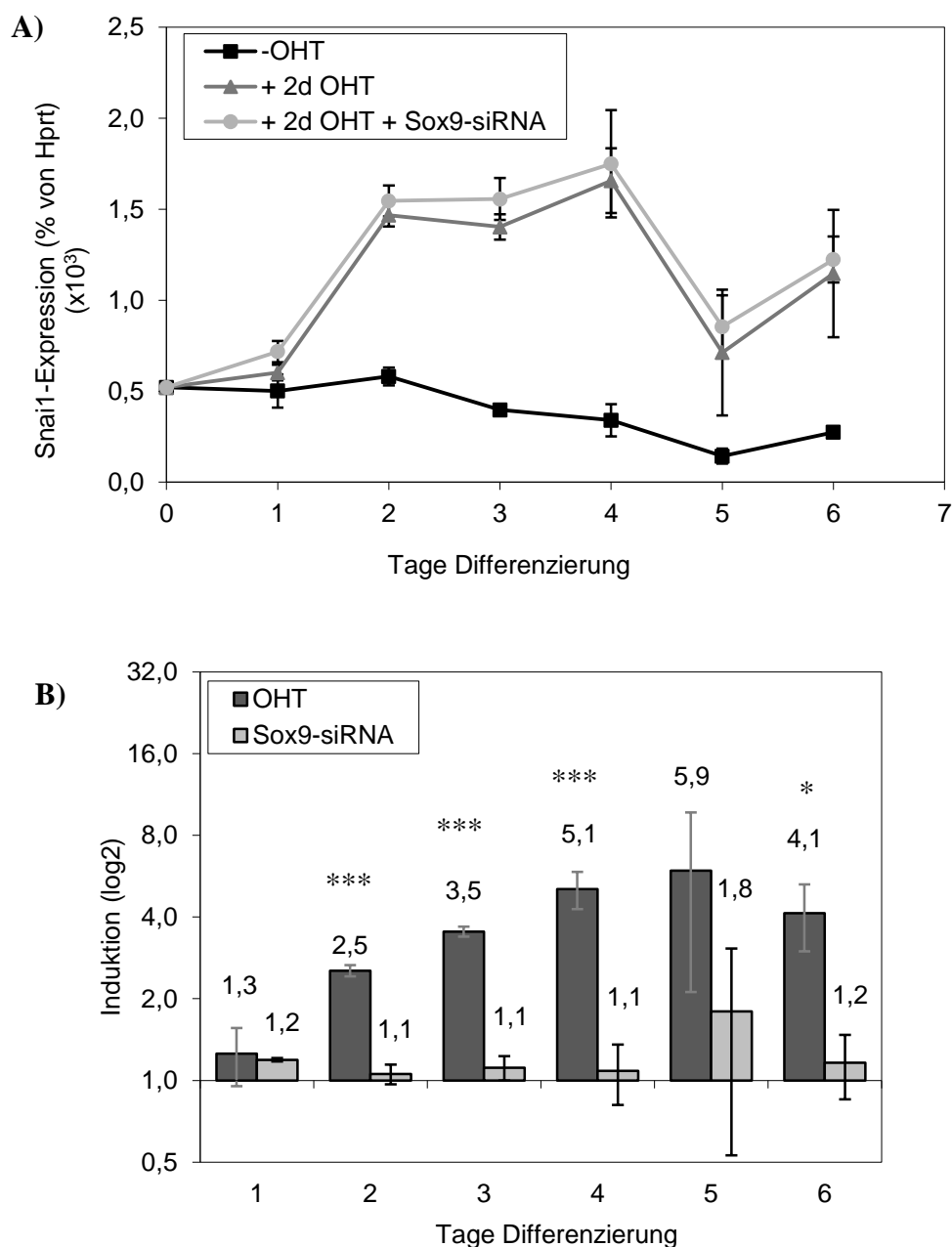


Abbildung 4.26 Die Herunterregulierung von *Sox9* hatte keinen Einfluss auf die durch Notch1 induzierte Zunahme der *Snai1*-Expression EB5-Nert Zellen wurden für 6 Tage neural differenziert. Notch1 wurde während der ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. Die Herunterregulierung von *Sox9* erfolgte durch die zusätzliche Zugabe von 100 nM *Sox9*-siRNA beim Start der Differenzierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Hprt

B) Induktion der Expression durch die Zugabe von 50 nM OHT für die ersten beiden Tage oder durch Zugabe von *Sox9*-siRNA Dunkle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe -OHT (schwarz) aus A); helle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT+*Sox9*-siRNA (hellgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) aus A)

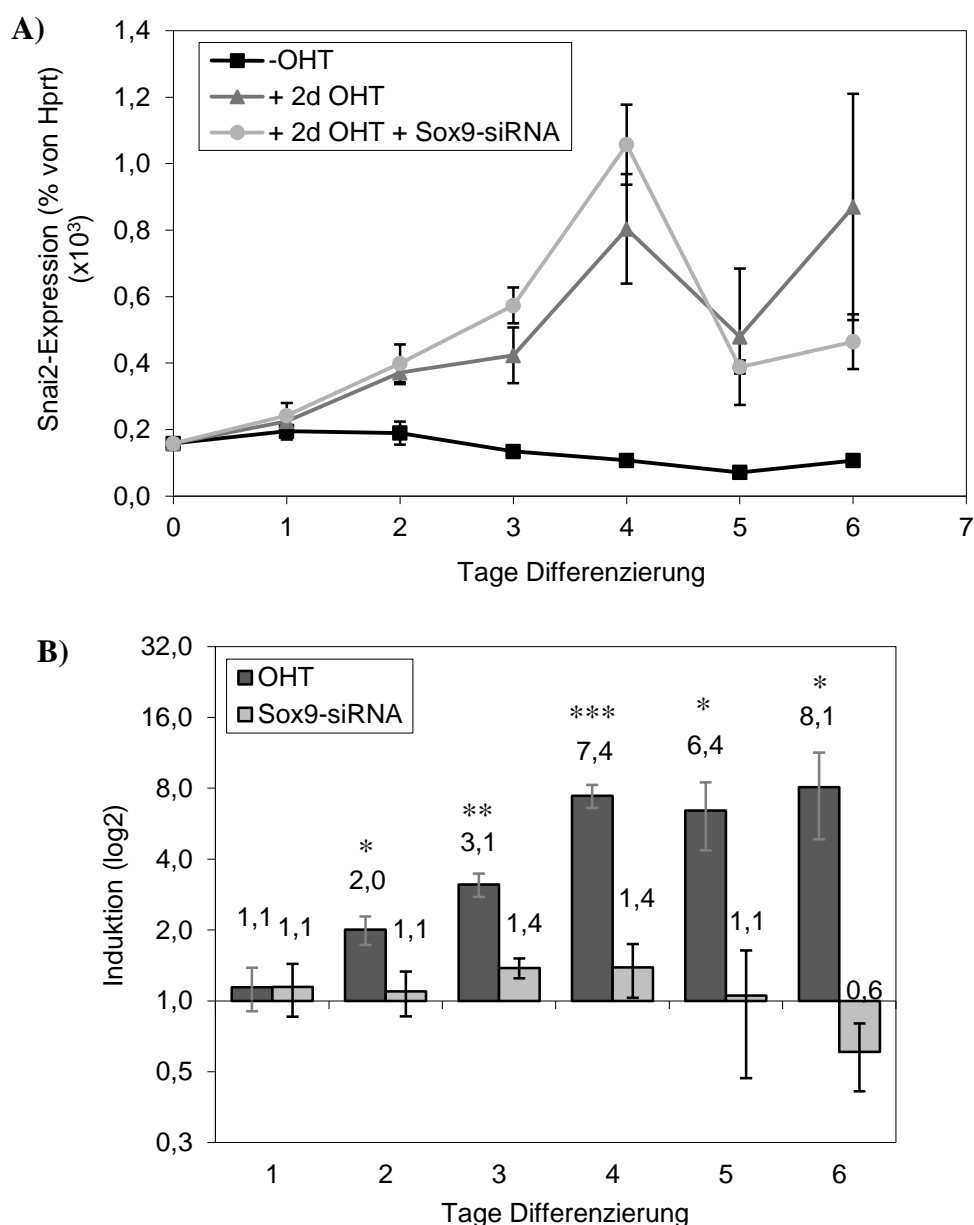


Abbildung 4.27 Die Herunterregulierung von *Sox9* hatte keinen Einfluss auf die durch Notch1 induzierte Zunahme der *Snai2*-Expression EB5-Nert Zellen wurden für 6 Tage neural differenziert. Notch1 wurde während der ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. Die Herunterregulierung von *Sox9* erfolgte durch die zusätzliche Zugabe von 100 nM *Sox9*-siRNA beim Start der Differenzierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf Hprt

B) Induktion der Expression durch die Zugabe von 50 nM OHT für die ersten beiden Tage oder durch Zugabe von *Sox9*-siRNA Dunkle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe -OHT (schwarz) aus A); helle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT+*Sox9*-siRNA (hellgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) aus A)

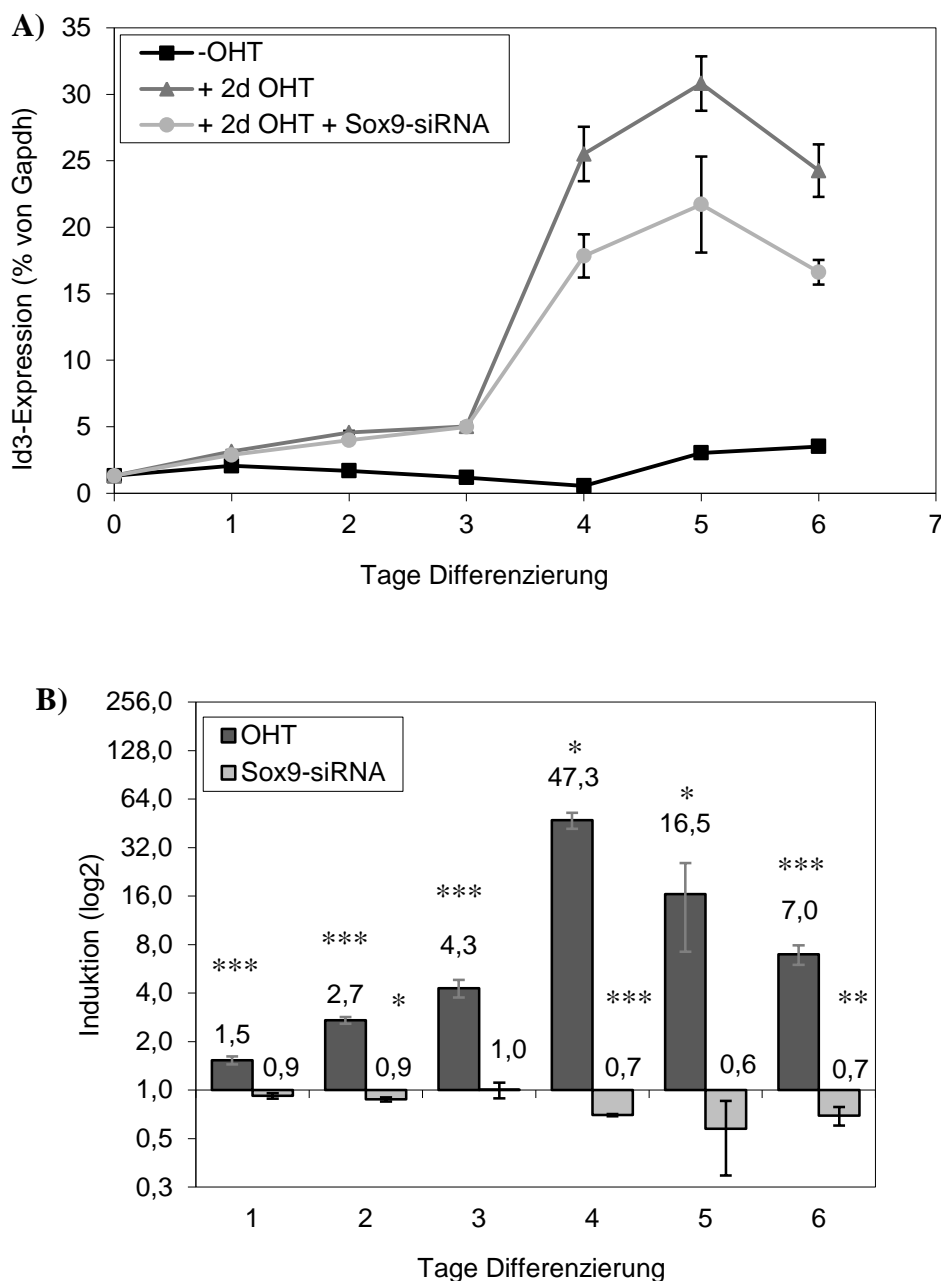


Abbildung 4.28 Die Herunterregulierung von *Sox9* bewirkte eine leichte Reversion der durch Notch1 induzierten Zunahme/Reduktion der *Id3*-Expression EB5-Nert Zellen wurden für 6 Tage neural differenziert. Notch1 wurde während der ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. Die Herunterregulierung von *Sox9* erfolgte durch die zusätzliche Zugabe von 100 nM *Sox9*-siRNA beim Start der Differenzierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf GAPDH

B) Induktion der Expression durch die Zugabe von 50 nM OHT für die ersten beiden Tage oder durch Zugabe von *Sox9*-siRNA Dunkle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe -OHT (schwarz) aus A); helle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT+*Sox9*-siRNA (hellgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) aus A)

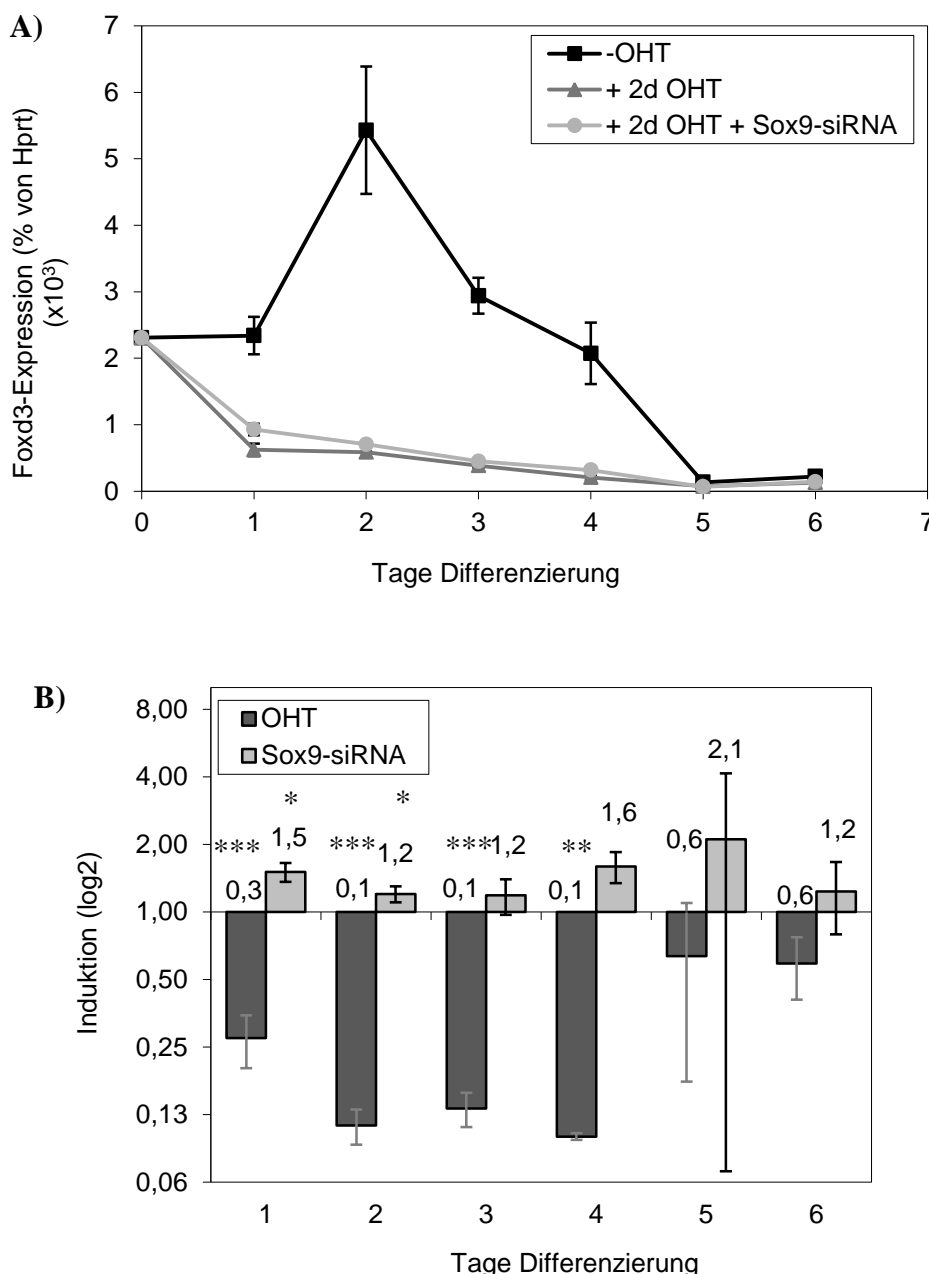


Abbildung 4.29 Die Herunterregulierung von *Sox9* bewirkte eine leichte Reversion der durch Notch1 induzierten Zunahme/Reduktion der *Foxd3*-Expression EB5-Nert Zellen wurden für 6 Tage neural differenziert. Notch1 wurde während der ersten beiden Tage der Differenzierung durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. Die Herunterregulierung von *Sox9* erfolgte durch die zusätzliche Zugabe von 100 nM *Sox9*-siRNA beim Start der Differenzierung. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression bezogen auf GAPDH

B) Induktion der Expression durch die Zugabe von 50 nM OHT für die ersten beiden Tage oder durch Zugabe von *Sox9*-siRNA Dunkle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe -OHT (schwarz) aus A); helle Balken: Werte der Datenreihe 2dOHT+*Sox9*-siRNA (hellgrau) bezogen auf Werte der Datenreihe 2dOHT (mittelgrau) aus A

4.3 Die Rolle von *Pax6* bei den durch Notch1 vermittelten Effekten während der neuralen Differenzierung

Nachdem die Rolle von *Sox9* für die Linienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen und für die Differenzierung in Neuralleistenzellen im Zusammenhang mit der Aktivierung von Notch1 untersucht wurde, soll nun auch der Einfluss, den die Notch1-induzierte Induktion des Transkriptionsfaktors *Pax6* auf die neurale *in vitro* Differenzierung hat, näher betrachtet werden. Wie unter 4.1 dargestellt, führte sowohl eine konstante als auch eine transiente Notch1-Aktivierung am Anfang der neuralen Differenzierung zu einer vermehrten Expression des Gliamarkers GFAP und einer Reduktion der Expression des Neuronenvorläufermarkers Tubb3. Durch FACS-Experimente ließ sich dieser Einfluss von Notch1 auf die Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen ebenfalls auf zellulärer Ebene nachweisen. Um die Rolle, die *Pax6* in dieser Entscheidung spielt zu untersuchen, wurde die gleiche Strategie angewandt wie für *Sox9* (siehe 2.6.3): Gleichzeitig mit einer Notch1-Aktivierung wurde *Pax6*-siRNA zugegeben, um die Expression von *Pax6* wieder auf das Ursprungslevel ohne Notch1-Aktivierung herunterzuregulieren. Anschließend sollte der Einfluss, den diese Herunterregulierung auf die durch Notch1 induzierte Änderung der Linienentscheidung hat durch FACS-Analysen analysiert werden. Dafür wurde zuerst der Expressionsverlauf von *Pax6*-RNA während der neuralen Differenzierung mit und ohne Aktivierung von Notch1 verfolgt (siehe 4.3.1). Anschließend wurde untersucht, ob *Pax6* ein direktes Zielgen von Notch1 während der neuralen Differenzierung ist (siehe 4.3.2) und die Herunterregulierung von *Pax6*-RNA und -Protein durch spezifische siRNA nachgewiesen (siehe 4.3.3). Darauf aufbauend wurde der Effekt, den ein Herunterregulieren von *Pax6* auf die durch Notch1 beeinflusste Linienentscheidung zugunsten von Gliazellen hat, ermittelt. Dafür wurde eine FACS-Analyse an Tag 14 der neuralen Differenzierung durchgeführt (4.3.4).

4.3.1 Zunächst Induktion, später Repression der *Pax6*-mRNA-Expression durch Notch1 während der neuralen Differenzierung

Um den Verlauf der *Pax6*-Expression während der neuralen Differenzierung mit und ohne Notch1-Aktivierung zu verfolgen, wurde ein RNA-Profil über einen Zeitraum von 12 bis 16 Tagen erstellt. Dabei wurde Notch1 durch die Zugabe von 50 nM OHT während der gesamten Differenzierungszeit oder nur an den ersten beiden Tagen der Differenzierung aktiviert. Abbildung 4.7 unter 4.1.3 zeigt, dass die Notch1-Aktivierung zu einem 1,8- bis 2,5-fachen Anstieg der *Pax6*-Expression während der ersten beiden Tage der Differenzierung führte. Anschließend erreichte die *Pax6*-Expression ohne Notch1-Aktivierung ein Maximum an Tag 8. Sowohl eine konstante als auch eine transiente Notch1-Aktivierung führte nach dem ersten Anstieg der *Pax6*-Expression zu einer starken Reduktion im Vergleich zur Expression ohne Zugabe von OHT, gefolgt von einem leichten Anstieg zum Ende der Differenzierung. Der Anstieg am Anfang der Differenzierung deutet darauf hin, dass mehr neuroepitheliale oder radiale Gliazellen gebildet wurden. Die anschließende Repression durch Notch1-Aktivierung deutet entweder auf eine fortschreitende Differenzierung oder auf die Bildung von *Pax6*-negativen radialen Gliazellen hin (siehe 4.2.1).

Abbildung 4.30 zeigt den Verlauf der *Pax6*-Expression während der neuralen Differenzierung ohne Notch1-Aktivierung und mit einer Notch1-Aktivierung, die jeden Tag für 4 Stunden durch 50 nM OHT induziert wurde. Direkt anschließend wurde die RNA geerntet und eine Real-Time PCR durchgeführt. „4h“ steht für eine vierstündige OHT-Induktion von embryonalen Stammzellen in neuralem Differenzierungsmedium, während „0“ in Abbildung 4.30 B bedeutet, dass zu embryonalen Stammzellen in Erhaltungsmedium für 4 Stunden OHT zugegeben wurde. In den ersten beiden Tagen und auch bereits nach 4 Stunden Differenzierung wurde *Pax6* durch die Zugabe von OHT induziert, während es in den darauffolgenden Tagen reprimiert wurde. Das bedeutet, dass auch bei einem normalen Differenzierungsverlauf ohne Notch1-Aktivierung die *Pax6*-Expression durch eine kurze Zugabe von OHT am Anfang der Differenzierung jeden Tag neu durch Notch1 induziert und an späteren Tagen reprimiert wurde.

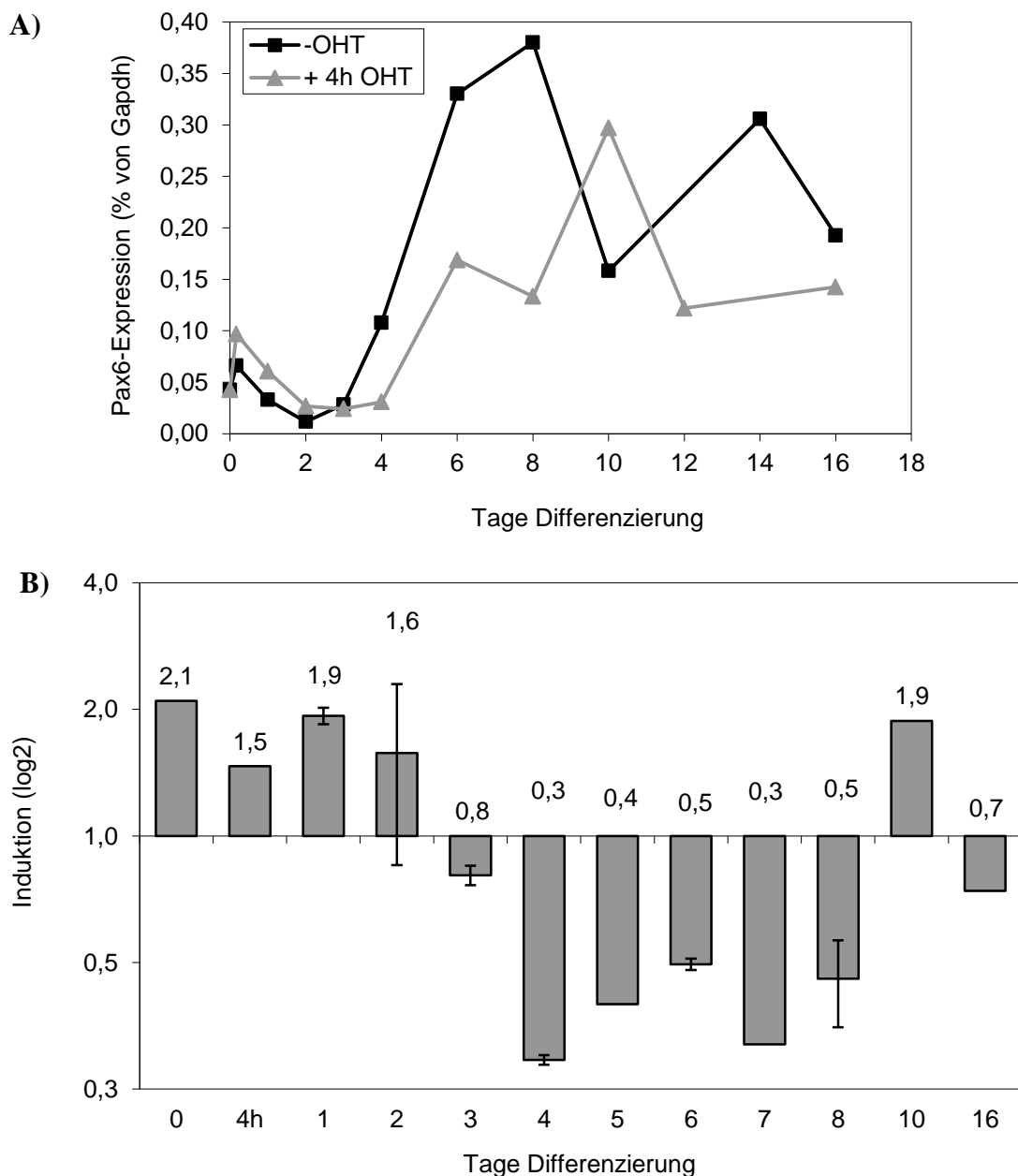


Abbildung 4.30 Die *Pax6*-mRNA-Expression wurde durch Notch1 zunächst induziert und später reprimiert EB5-Nert Zellen wurden für 16 Tage neural differenziert und die *Pax6*-Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Notch1 wurde abschließend vor der Ernte der RNA für vier Stunden durch Zugabe von 50 nM OHT aktiviert.

A) Relative Expression bezogen auf Gapdh Dargestellt sind Einzelwerte eines Experiments. Das Experiment wurde einmal (undifferenzierte Zellen mit OHT, 4 Stunden, Tag 5, 7 und 10 bis 16) oder zweimal (undifferenzierte Zellen ohne OHT, Tag 1 bis 4, 6 und 8) durchgeführt.

B) Induktion der Expression durch Notch1-Aktivierung Dargestellt sind Einzelwerte (undifferenzierte Zellen, 4 Stunden, Tag 5, 7, 10 und 16) oder der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei Experimenten (Tag 1 bis 4, 6 und 8).

4.3.2 Induktion von Pax6 während der frühen neuralen Differenzierung durch Notch1-Aktivierung in Abwesenheit von Proteinsynthese

Um festzustellen, ob *Pax6* während der neuralen Differenzierung ein direktes Zielgen von Notch1 ist, wurden 50 µg/ml Cycloheximid zu undifferenzierten EB5-Nert Zellen und zu EB5-Nert Zellen, die für einen beziehungsweise fünf Tage neural differenziert worden waren gegeben. 30 Minuten später wurde Notch1 durch die Zugabe von 50 nM OHT für 4 Stunden aktiviert. Die Zugabe von Cycloheximid zu lebenden Zellen führt zur Blockierung der Proteinbiosynthese. Dieses Experiment ermöglicht es daher, direkte von indirekten Zielgenen zu unterscheiden. Es ist bereits bekannt, dass *Pax6* ein direktes Zielgen von Notch1 in ES-Zellen ist, die für 4 Stunden in ektoderm-begünstigendem Medium gehalten wurden (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Aus Abbildung 4.31 A geht hervor, dass die *Pax6*-Expression sowohl in undifferenzierten embryonalen Stammzellen als auch in Zellen, die für einen Tag neural differenziert worden waren, durch die Zugabe von OHT stieg, während sie an Tag 5 stark sank. Den gleichen Effekt erzielte die Aktivierung von Notch1 auch nach Zugabe von Cycloheximid. Die Induktion durch OHT war in embryonalen Stammzellen und an Tag 1 der Differenzierung auch in den Ansätzen mit Cycloheximid signifikant. Allerdings verringerte sich der Anstieg in undifferenzierten embryonalen Stammzellen und an Tag 1 der Differenzierung von 1,7- beziehungsweise 1,9-fach auf 1,3- bzw. 1,4-fach. Dies bestätigt, dass *Pax6* in embryonalen Stammzellen und an Tag 1 der neuralen Differenzierung vermutlich ein direktes Zielgen von Notch1 ist. An Tag 5 wird die Expression von *Pax6* durch Notch1 nur sehr leicht reprimiert, was darauf hindeutet, dass *Pax6* an Tag 5 indirekt durch Notch1 reguliert wird. Cycloheximid alleine bewirkte einen 1,5- bis 5,3-fachen Anstieg der *Pax6*-Expression zu allen untersuchten Zeitpunkten.

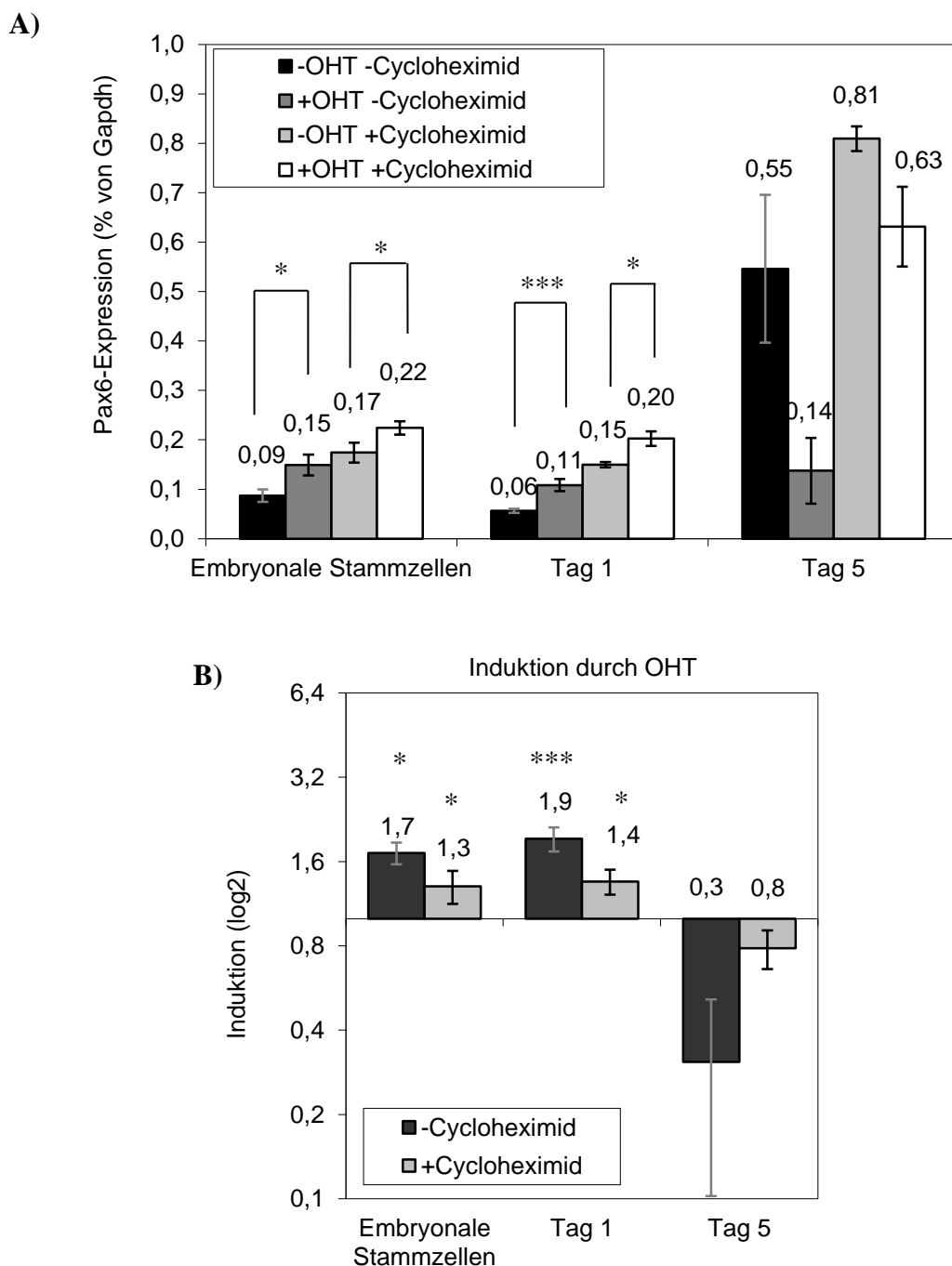


Abbildung 4.31 Pax6 wird auch in Abwesenheit von Proteinsynthese zu Beginn der Differenzierung durch Notch1 aktiviert Zu undifferenzierten, für einen oder fünf Tage neural differenzierten EB5-Nert Zellen wurden 50 µg/ml Cycloheximid zugegeben. Die Aktivierung von Notch1 erfolgte 30 Minuten später durch die Zugabe von 50 nM OHT. Die RNA-Isolierung erfolgte 4 Stunden später. Anschließend wurde eine Real-Time PCR durchgeführt und die Pax6-Expression auf Gapdh normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei (Tag 5) oder drei Experimenten. Für Tag 5 konnte kein T-Test durchgeführt werden, da nur zwei Werte vorhanden waren.

*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$

A) Relative Expression von Pax6 mit und ohne Notch1-Aktivierung beziehungsweise Cycloheximid Die Pax6-Expression steigt durch OHT sowohl mit als auch ohne Cycloheximid in ES-Zellen und an Tag 1. Sie sinkt an Tag 5.

B) Induktion der Expression von Pax6 durch Notch1-Aktivierung Die Induktion durch OHT ist an den ersten beiden untersuchten Tagen mit und ohne Cycloheximid positiv und an Tag 5 negativ.

4.3.3 Herunterregulierung der *Pax6*-mRNA als auch des Pax6-Proteins durch *Pax6*-siRNA

Das Gelingen der Herunterregulierung der *Pax6*-RNA durch siRNA ist eine Grundvoraussetzung für die Anwendung der siRNA-Strategie. Da die *Pax6*-Expression lediglich am Anfang der Differenzierung durch Notch1 induziert wird, war dieser Zeitpunkt der einzig mögliche für den Einsatz der siRNA. Zusammen mit dem Start der neuralen Differenzierung wurde *Pax6*-siRNA in einer Konzentration von 50 nM und OHT ebenfalls in einer Konzentration von 50 nM zugegeben. In allen Ansätzen war das Transfektionsreagenz enthalten. Nach 24 Stunden wurde RNA geerntet, um anschließend eine Real-Time PCR durchzuführen. In Abbildung 4.32 ist zu erkennen, dass die *Pax6*-Expression sich durch die Zugabe von OHT in etwa verdoppelt und die zusätzliche Zugabe von *Pax6*-siRNA zu einer Reversion dieses Effektes führt. Dabei fällt die Expression sogar unter das Ursprungslevel ohne Notch1-Aktivierung. Für folgende Experimente kann also davon ausgegangen werden, dass die *Pax6*-Expression effektiv herunterreguliert werden kann und somit der Einfluss von *Pax6* auf Notch1-induzierte Effekte untersucht werden kann.

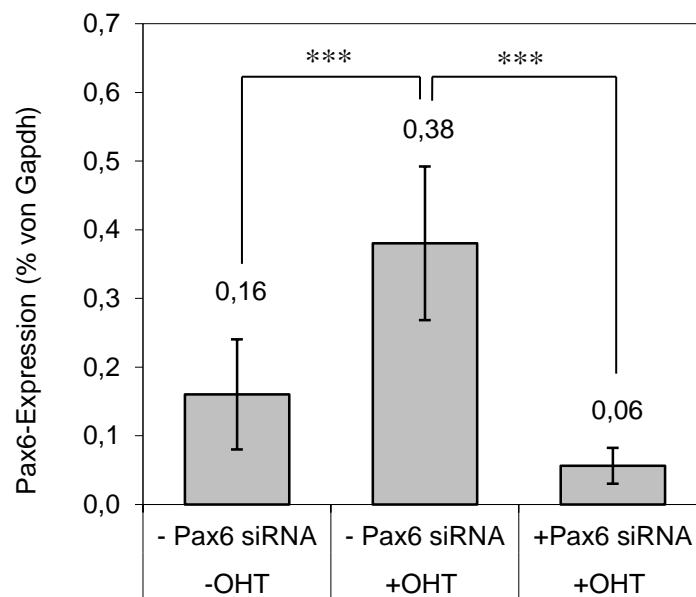


Abbildung 4.32 *Pax6*-siRNA regulierte *Pax6*-mRNA-Expression herunter In EB5-Nert Zellen wurde gleichzeitig die neurale Differenzierung induziert, 50 nM OHT und 50 nM *Pax6*-siRNA zugegeben. Nach 24 Stunden wurde RNA geerntet und eine Real-Time PCR durchgeführt. Die *Pax6*-Expression wurde auf Gapdh normalisiert. Die Induktion durch OHT wurde durch die siRNA abgefangen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von sieben Experimenten. ***: $p < 0,005$

Um eine Herunterregulierung auch für das Pax6-Protein nachzuweisen, wurde 24 Stunden nach der Induktion der Differenzierung und der Zugabe von 50 nM *Pax6*-siRNA und 50 nM OHT eine FACS-Analyse durchgeführt. Auch hier war in allen Ansätzen das Transfektionsreagenz vorhanden. In allen drei durchgeführten Experimenten war es möglich, die durch Notch1 hervorgerufene Erhöhung des Anteils an Pax6-positiven Zellen durch den gleichzeitigen Einsatz von *Pax6*-siRNA wieder zu reduzieren. Dabei wurde in etwa der Wert ohne Notch1-Aktivierung erreicht (Abb. 4.33).

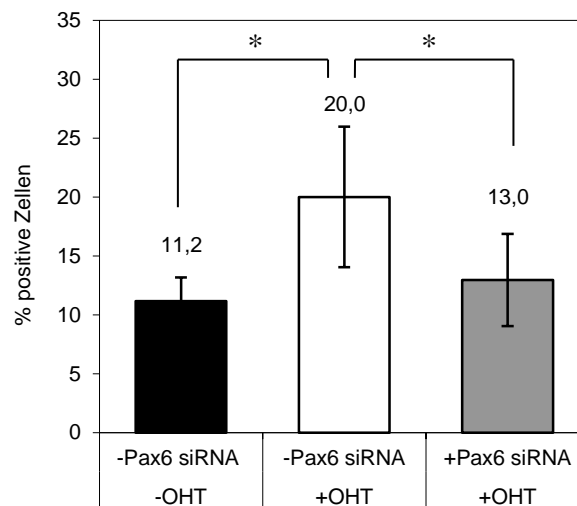


Abbildung 4.33 *Pax6*-siRNA regulierte Pax6-Proteinexpression herunter

Zu EB5-Nert Zellen wurden 50 nM OHT und *Pax6*-siRNA in einer Konzentration von 50 nM gegeben. Gleichzeitig wurde die neurale Differenzierung induziert. Nach 24 Stunden wurde eine FACS-Analyse der Pax6-positiven Zellen durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Der Anteil der Pax6-positiven Zellen wurde durch gleichzeitige Zugabe von *Pax6*-siRNA und OHT signifikant reduziert. *: $p < 0,05$

4.3.4 Kein offensichtlicher Einfluss von *Pax6* auf die durch Notch1 induzierte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen

Wie unter 4.1.2 und 4.1.3 gezeigt, bewirkte eine Aktivierung von Notch1 eine vermehrte Bildung von Zellen mit Stammzell- oder Vorläufercharakter (Sox2- und Nestin-positiv) sowie von Gliazellen (GFAP-positiv) und eine Reduktion der Neuronenvorläuferzellen (Tubb3-positiv). *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass die Überexpression von Pax6 in embryonalen Stammzellen ihre Differenzierung in neuroepitheliale Vorläuferzellen fördert (Suter *et al.*, 2009). Weitere Überexpression von Pax6 in neuroepithelialen Vorläuferzellen führt zu fortschreitender Differenzierung in radiale Gliazellen, vermehrter Bildung von Neuronen und verstärkter Migration von jungen Neuronen aus Vorläuferzellenkolonien heraus, während der Knockdown von Pax6 in neuroepithelialen Zellen die weitere Differenzierung in radiale Gliazellen reprimiert (Suter *et al.*, 2009). *In vivo* Untersuchungen deuten darauf hin, dass Pax6 für die Erhaltung des

neuralen Stammzellpools wichtig ist, die vorzeitige Differenzierung inhibiert und anschließend die Entwicklung in Neuronen fördert (Philips et al., 2005; Quinn et al., 2007). Es ist zusätzlich in Astrozyten und Astrozytenvorläufern exprimiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Pax6 für die neurale Spezifizierung von embryonalen Stammzellen und ihre weitere Differenzierung in radiale Gliazellen verantwortlich ist, aber auch an der Entwicklung von Neuronen aus radialen Gliazellen und an der Ausreifung von Astrozyten beteiligt ist. Ob es zur Erhaltung von neuralen Stamm- und Vorläuferzellen oder aber zu deren weiteren neuronalen Differenzierung beiträgt, ist kontextabhängig.

Da Pax6 also entscheidend auf die Differenzierung von neuralen Zellen einwirkt und es zudem ein direktes Notch1-Zielgen ist, sollte untersucht werden, ob *Pax6* einen Einfluss auf die durch Notch1 verursachten Effekte während der neuralen Differenzierung hat. Dazu wurden EB5-Nert Zellen für 12 bis 14 Tage neural differenziert und anschließend mittels FACS-Analyse die Anzahl der für die Marker Nestin, Sox2, GFAP und Tubb3 positiven Zellen untersucht. Notch1 wurde dabei konstant über den gesamten Zeitraum der Differenzierung oder lediglich während der ersten beiden Tage durch die Zugabe von 50 nM OHT aktiviert. *Pax6* wurde durch die Zugabe von 50 nM *Pax6*-siRNA beim Start der Differenzierung herunterreguliert.

Aus der Abbildung 4.34 geht hervor, dass die Herunterregulierung von *Pax6* unter keiner der beiden Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die prozentuale Anzahl der Nestin-, Sox2-, GFAP- oder Tubb3-positiven Zellen hat. Für GFAP deutete sich nach einer konstanten Notch1-Aktivierung über den gesamten Zeitraum der Differenzierung eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion des Anteils der GFAP-positiven Zellen durch die Herunterregulierung von *Pax6* an. Nach einer transienten Notch1-Aktivierung konnte für Tubb3 eine Tendenz zu mehr positiven Zellen nach *Pax6*-Herunterregulierung beobachtet werden. Hierbei ist zu beachten, dass für die Herunterregulierung von Pax6 jeweils nur drei Experimente durchgeführt wurden.

Es kann festgestellt werden, dass kein Einfluss der Herunterregulierung von *Pax6* zu Beginn der Differenzierung und somit der durch Notch1 direkt induzierten Erhöhung der *Pax6*-Expression während der ersten beiden Tage der Differenzierung auf die durch Notch1 geförderte Gliazelldifferenzierung nachgewiesen werden konnte. Auch das durch Notch1-Aktivierung vermehrte Auftreten von Zellen mit Stammzell- oder Vorläufercharakter wird durch Pax6 nicht nachweisbar beeinflusst. Für Nestin ließ sich lediglich nach der konstanten Notch1-Aktivierung ein Anstieg der positiven Zellen beobachten. Da nach transientser Aktivierung von Notch1 kein Effekt auf die Nestin-positiven Zellen erkennbar war, war hier auch keine Reversion durch eine *Sox9*-Herunterregulierung möglich. Da Nestin ein direktes Zielgen von Notch1 ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der nach konstanter Aktivierung beobachtete Anstieg des Anteils der Nestin-positiven Zellen auf eine direkte Aktivierung durch Notch1 zurückzuführen ist und damit vermutlich nicht über Pax6 reguliert wird. Für Nestin ist zusätzlich zu beachten, dass späte Tage

der Differenzierung analysiert wurden und ein weiterer oder abweichender Einfluss auf diesen Notch1-Effekt möglicherweise früher in der Differenzierung sichtbar geworden wäre. Eine Reversion der lediglich nach transienter Notch1-Aktivierung erkennbaren leichten Induktion der Sox2-positiven Zellen könnte möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung beobachtet werden, wenn nach Einbeziehung der Real-Time PCR Daten eine stabilere und stärkere Induktion der Sox2-positiven Zellen zu erwarten gewesen wäre. Zu diesem Zeitpunkt allerdings lässt die erhöhte Sox2-Expression eher auf ein verstärktes Auftreten von Gliazellen schließen, wobei mit Hilfe dieses Gens alleine nicht zwischen Gliazellen und neuronalen oder embryonalen Stammzellen unterschieden werden kann. Daher ist es möglich, dass die *Pax6*-Herunterregulierung einen Effekt auf eine dieser Populationen hatte, dies mit Hilfe der Anzahl an Sox2-positiven Zellen alleine aber nicht nachgewiesen werden kann. Eine Beobachtung von Sox2 als neuronalen Stammzellmarker wäre an früheren Tagen, in denen Sox2 durch Notch1 herunterreguliert wird, eher möglich.

Zusätzlich war keine Auswirkung auf die Inhibierung der Bildung von Neuronenvorläuferzellen nachweisbar. Zwar ließ sich unter beiden untersuchten Bedingungen eine leichte Reversion erkennen, diese war aber in beiden Fällen nicht signifikant. Dies kann nicht auf eine unzureichende Herunterregulierung von *Pax6* zurückgeführt werden, da die *Pax6*-Expression und auch die Anzahl der Pax6-positiven Zellen durch die *Pax6*-siRNA auf das Ursprungslevel ohne Notch1-Aktivierung oder sogar darunter herunterreguliert werden konnte und daher ein deutlich sichtbarer Effekt durch den Einsatz der siRNA zu erwarten war. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die durch Pax6 geförderte Differenzierung in Neuronen möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung ausgeübt wird. Zu diesem Zeitpunkt ist Pax6 in der neuronalen Differenzierung durch Notch1-Aktivierung reprimiert. Das bedeutet, dass es diese Funktion in dem in diesen Experimenten geschaffenen Kontext möglicherweise nicht ausführen kann. Es ist aber ebenso möglich, dass auch für die Beobachtung dieses Notch1-Effektes der falsche Zeitpunkt betrachtet wurde, und die Neuronendifferenzierung nach Pax6-Herunterregulierung erst verzögert nach dem Tag 14 sichtbar wird. Außerdem muss bedacht werden, dass das Ausschalten oder Herunterregulieren eines einzigen Gens wie *Pax6* durch Redundanzen anderer Faktoren ausgeglichen werden könnte.

Insgesamt konnte also nicht nachgewiesen werden, dass die gesteigerte *Pax6*-Expression am Anfang der Differenzierung für die durch Notch1 induzierte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen und das vermehrte Auftreten von Stamm- und Vorläuferzellen eine Rolle spielt, die mit diesem „Readout“ an Tag 12 bis 14 der Differenzierung festgestellt werden kann. Wenn man die mit Notchfunktionen überlappende Funktionen von Pax6, zuerst die Bildung von neuroepithelialen und anschließend von radialen Gliazellen zu fördern, in Betracht zieht, und gleichzeitig bedenkt, dass Notch1 die Expression von *Pax6* während der ersten beiden Tage der

Differenzierung erhöht, dann könnte man einen sichtbaren Effekt durch Pax6 bereits nach drei Tagen vermuten. Die verstärkte oder schnellere Bildung von neuroepithelialen Zellen lässt sich mit der hier verwandten Differenzierungsmethode möglicherweise sehr schlecht untersuchen, da die Bildung von Mesoderm und Endoderm durch die Medienbedingungen bereits unterdrückt wird, eine vermehrte Bildung von Ektoderm durch Notch1 oder Pax6 also gar nicht möglich ist. Hierzu müsste ein Differenzierungssystem, dass eine unvoreingenommene Differenzierung aller drei Keimblätter zulässt, verwandt werden. Die verstärkte Bildung von radialen Gliazellen aus neuroepithelialen Zellen, der zweite mit Notchfunktionen vereinbare Pax6-Effekt, ließe sich innerhalb dieses Systems möglicherweise anhand der beobachteten schnelleren Differenzierung nach Notch1-Aktivierung zu Beginn der Differenzierung untersuchen.

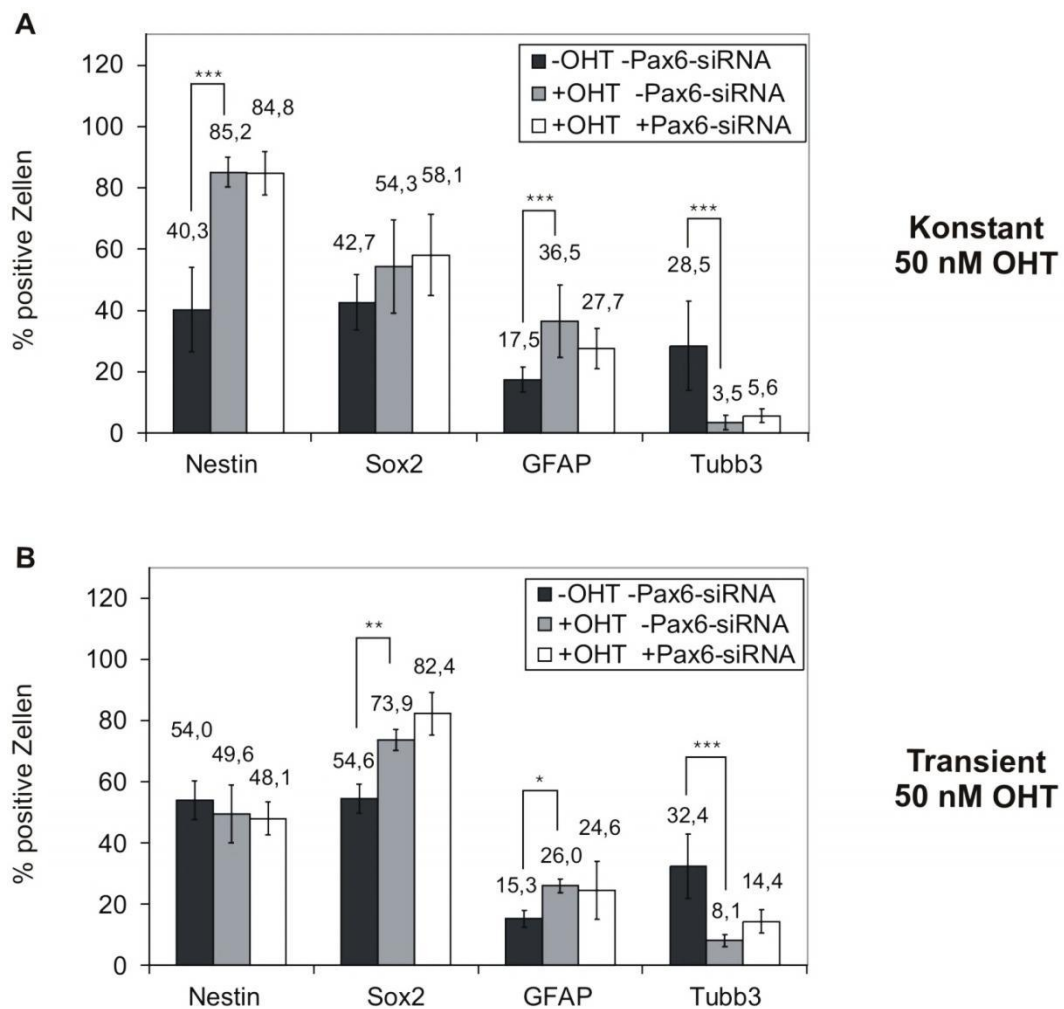


Abbildung 4.34 Ein Einfluss von Pax6 auf die durch Notch1-Aktivierung regulierte Linienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen oder auf die Erhaltung von Stammzellcharakter konnte nicht nachgewiesen werden EB5-Nert Zellen wurden 12 bis 14 Tage neural differenziert. 50 nM OHT wurden konstant über den gesamten Differenzierungszeitraum oder transient während der ersten beiden Tage der Differenzierung zugegeben. 50 nM Pax6-siRNA wurden zum Start der Differenzierung zugegeben. Anschließend wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier bis sechs (ohne Pax6-siRNA) oder drei (mit Pax6-siRNA) Experimenten. Die Herunterregulierung von Pax6 hatte keine signifikanten Auswirkungen. Lediglich nach transientser Notch1-Aktivierung war ein leichter Anstieg der Tubb3-positiven Zellen zu beobachten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$

4.4 Die Rolle von *Runx1* bei der durch Notch1 vermittelten Reduktion der Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung

Es ist bekannt, dass Notch die Bildung von Flk-1-positiven Zellen inhibiert (Schroeder *et al.*, 2006; Meier-Stiegen *et al.*, 2010) und *Runx1* an der Herunterregulierung der Flk1-Expression beteiligt ist (Lacaud *et al.*, 2002; Hirai *et al.*, 2005). Ebenfalls nachgewiesen wurde, dass *Runx1* ein direktes Zielgen von Notch1 ist und seine Expression durch die Aktivierung von Notch1 in mesodermalen Vorläuferzellen induziert wird (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Diese Induktion wurde an Tag 4 der mesodermalen Differenzierung nachgewiesen. Für diese Experimente wurde ein zweidimensionales mesodermales Differenzierungssystem auf Kollagen verwandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die embryonalen Stammzellen in dem dreidimensionalen System der *embryoid bodies* differenziert. Hierbei konnte ein Maximum der *Runx1*-Expression und der Flk-1-positiven Zellen an Tag 5 der Differenzierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde der Tag 5 für weitere Analysen ausgewählt. Die Bildung von Flk-1-positiven Zellen wurde mittels FACS-Analysen mit und ohne Notch1-Aktivierung untersucht. Der Einfluss von Notch1 auf die Expression von *Runx1* wurde mithilfe eines Reportergenkonstrukts, das in CCE-Zellen eingefügt wurde untersucht. Es besteht aus einer modifizierten Form des YFP (venus), das in den 5'UTR eines der beiden *Runx1*-Allele unter der Kontrolle des proximalen Promotors P2 eingefügt wurde (Hirai *et al.*, 2005). Bei einer Aktivierung des Promotors durch Notch1 wird venus exprimiert und ist ohne weitere Färbung in FACS-Experimenten nachweisbar. Um zu untersuchen, ob die Reduktion von Flk-1-positiven Zellen durch Notch1 über die Aktivierung von *Runx1* verläuft, wurde zunächst die Anzahl der Flk-1- und venus-positiven Zellen ohne und mit Notch1-Aktivierung betrachtet. Dazu wurde Notch1 durch die Zugabe von 500 nM OHT zu Beginn der Differenzierung für 24 Stunden aktiviert. Aus Abbildung 4.35 geht hervor, dass Notch1 in Zellen, die das Nert-Konstrukt enthielten die Anzahl der Flk1-positiven Zellen stark reduzierte und die der venus-positiven Zellen erhöhte. In den Kontrollzellen, die nur mit dem leeren Kontrollvektor pCAG-IP transfiziert worden waren, waren diese beiden Effekte nicht sichtbar, was bedeutet, dass OHT alleine keine Auswirkungen auf die Bildung dieser beiden Populationen hatte (Abb. 4.35 B). Diese Ergebnisse bestätigen bereits bekannte Ergebnisse aus der Literatur und zeigen, dass Notch1 den Promotor von *Runx1* aktiviert. Der nächste Schritt wäre die Herunterregulierung von *Runx1* mit Hilfe von siRNA und die gleichzeitige Aktivierung von Notch1. Anschließend würde der Einfluss auf die Anzahl Flk-1-positiver Zellen als „Readout“ untersucht werden. Mit Hilfe dieser siRNA-Strategie (siehe 2.7.3) kann festgestellt werden, ob *Runx1* die durch Notch1 hervorgerufene Reduktion der Anzahl der Flk-1-positiven Zellen vermittelt. Bisher konnte keine zufriedenstellende Herunterregulierung von *Runx1*-mRNA durch *Runx1*-siRNA in *embryoid bodies* während der mesodermalen Differenzierung erzielt werden,

was möglicherweise auf die dreidimensionale Struktur der *embryoid bodies* zurückzuführen ist. Die *Runx1*-siRNA ist in embryonalen Stammzellen in der Lage, eine Herunterregulierung von 76% zu erreichen und die *GAPDH*-siRNA, die in embryonalen Stammzellen zu einer Herunterregulierung von 80 bis 90% fähig ist, erreicht in *embryoid bodies* lediglich eine Herunterregulierung von 57% (Daten nicht gezeigt). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die *Runx1*-siRNA an sich funktioniert. Dieses Problem lässt sich möglicherweise mit einem anderen, zweidimensionalen Differenzierungssystem auf Collagen lösen, in dem die Zellen räumlich leichter zugänglich für die siRNA sind. Eine andere Möglichkeit ist die Zellen zunächst in hängenden Tropfen zu differenzieren und zu einem passenden Zeitpunkt, zum Beispiel Tag 3 oder 4 die Zellen der *embryoid bodies* zu dissoziieren und neu auszusäen, um sie anschließend mit siRNA zu transfizieren. Alternativ könnte man eine andere Transfektionsmethode wählen oder stabile Konstrukte in die Zellen einbringen, die konditional induzierbar sind.

Insgesamt stellen die bisher erhaltenen Ergebnisse einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Analysen des Zusammenhangs zwischen Notch1, Runx1 und der Reduktion der Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung dar.

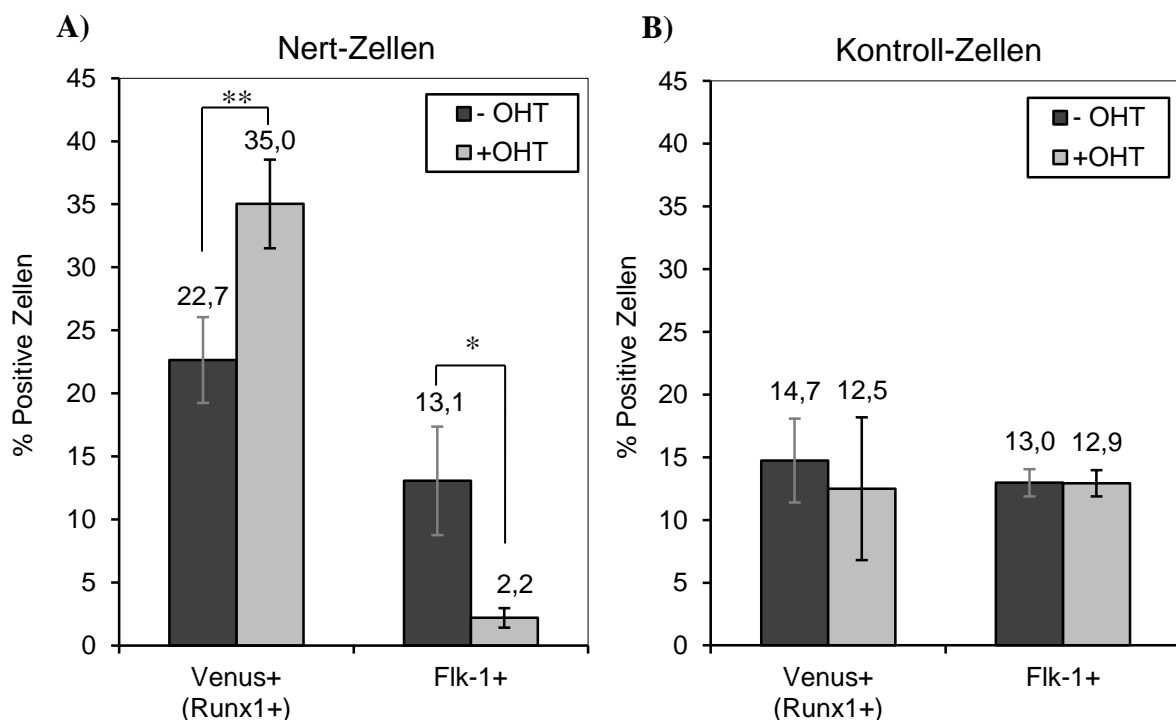


Abbildung 4.35 Notch1-Aktivierung bewirkte eine Reduktion der Flk-1-positiven Zellen und eine Induktion der Venus (Runx1)-positiven Zellen CCE-Runx1-venus Nert- und Kontroll-Zellen wurden fünf Tage mesodermal differenziert. Notch1 wurde zu Beginn der Differenzierung für 24 Stunden durch Zugabe von 500 nM OHT aktiviert. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

A) Notch1 induzierte die Bildung von Venus (Runx1)-positiven Zellen und reduzierte den Anteil der Flk-1-positiven Zellen

B) Die Zugabe von OHT alleine hatte keine Auswirkungen auf den Anteil der Venus (Runx1)- oder Flk-1-positiven Zellen in CCE-Runx1-venus Kontroll-Zellen

(Modifiziert nach Meier-Stiegen *et al.*, 2010)

5. Diskussion

Der Notch-Signalweg nimmt äußerst vielfältige Funktionen sowohl im embryonalen als auch im adulten Organismus wahr. Auf molekularer Ebene ist vieles über die Funktionsweise des Signalweges und seine Komponenten bekannt. Auch einige sehr früh entdeckte Zielgene wie die *Hes*- und *Hey*-Gene sind zum Teil gut untersucht. Es gibt allerdings auch viele Effekte von Notch, unter anderem auf verschiedene Zelllinienentscheidungen, deren Mechanismus und Regulation nicht aufgeklärt sind. Dazu gehören beispielsweise die durch Notch beeinflusste Zelllinienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen (Taylor *et al.*, 2007) und die Differenzierung in Neuralleistenzellen beziehungsweise Zellen des zentralen Nervensystems (Endo *et al.*, 2002; Glavic *et al.*, 2004), aber auch die Reduktion Flk-1-positiver Zellen während der mesodermalen Differenzierung (Schroeder *et al.*, 2006). Auf der anderen Seite konnten wir direkte Zielgene von Notch1 identifizieren, deren Einfluss auf die durch Notch hervorgerufenen Effekte nicht geklärt ist (Meier-Stiegen *et al.*, 2010; Schwanbeck *et al.*, 2011). Zu diesen Zielgenen gehören die Transkriptionsfaktoren *Sox9*, *Pax6* und *Runx1*. Ihre Überexpression oder ihr Ausschalten führen zu unterschiedlichen Effekten in verschiedenen Geweben während der Embryonalentwicklung beziehungsweise im adulten Organismus (siehe 2.3, 2.4, 2.5 und unten). Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die bekannten Effekte von Notch1 während der Neurogenese (Abb. 1.5) und während der mesodermalen Entwicklung im Zusammenhang mit seiner Regulation dieser drei Zielgene stehen. Dazu wurden embryonale Stammzellen verwandt, in die das Tamoxifen-induzierbare NERT-Konstrukt (siehe 2.7.2) stabil transfiziert worden war. Das NERT-Konstrukt besteht aus dem intrazellulären konstitutiv aktiven Teil des Notch1-Rezeptors, der an die Tamoxifen-sensitive Mutante der Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors fusioniert wurde. Es wird konstitutiv exprimiert und durch HSP90 im Cytoplasma zurückgehalten. Durch die Zugabe von OHT wird es vom HSP90-Protein freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren, um seine Zielgene zu aktivieren. Auf diese Art und Weise kann Notch1 in den verwandten ES-Zellen sehr zeitnah konditionell aktiviert werden. Um den Einfluss der drei Notch1-Zielgene näher betrachten zu können, wurde die unter 2.7.3 beschriebene siRNA-Strategie angewandt. Mit ihr ist es möglich, einzelne Zielgene mittels siRNA herunterzuregulieren und gleichzeitig Notch1 durch Zugabe von OHT zu aktivieren. Damit soll das physiologische Level des Zielgens ohne Notch1-Aktivierung erreicht werden, während alle anderen Notch1-Zielgene weiterhin unverändert aktiviert werden. So kann die Rolle eines spezifischen Zielgens während eines Notch1-Effektes untersucht werden. Dafür wurden die Effekte, die Notch1 während der Neurogenese hat (Endo *et al.*, 2002; Glavic *et al.*, 2004; Lowell *et al.*, 2006; Bolos *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007; Cau und Blader, 2009), für die hier eingesetzte neurale Differenzierung (Ying *et al.*, 2003) und die hier verwandten Zellen mit dem NERT-

Konstrukt untersucht (siehe 5.1). Die durch Notch1 hervorgerufene Reduktion von Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung wurde bereits mehrfach veröffentlicht (Schroeder *et al.*, 2006; Meier-Stiegen *et al.*, 2010) und wurde im Rahmen dieser Arbeit für das verwandte mesodermale Differenzierungssystem im hängenden Tropfen erneut nachgewiesen (siehe 5.4). Darauf aufbauend wurde der Einfluss der drei Zielgene *Sox9*, *Pax6* und *Runx1* auf die für sie relevanten Notch1-Effekte näher betrachtet (5.2, 5.3 und 5.4).

5.1 Einfluss von Notch1 auf die neurale Differenzierung

Während der embryonalen Neurogenese fördert Notch zuerst die Entwicklung von neuroektodermalen Zellen und inhibiert die Differenzierung in mesodermale Zelltypen (Lowell *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006). Anschließend ist es für die Erhaltung von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen verantwortlich und verhindert deren vorzeitiges Ausdifferenzieren in Neuronen (Bolos *et al.*, 2007; Cau und Blader, 2009). Zusätzlich dazu spielt es bei verschiedenen Zelllinienentscheidungen während der neuronalen Differenzierung eine essentielle Rolle: es inhibiert die Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Neuronen und fördert ihre Entwicklung in Gliazellen, es begünstigt die Differenzierung in Astrozyten gegenüber der in Oligodendrozyten und ist an verschiedenen Zelllinienentscheidungen zwischen unterschiedlichen Neuronentypen beteiligt (Tanigaki *et al.*, 2001; Grandbarbe *et al.*, 2003; Del Barrio *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007). Außerdem ist bekannt, dass Notch Funktionen während der Neuralleistenentwicklung wahrnimmt. Zunächst ist es bei Vögeln und Fischen an der Spezifizierung der Neuralleiste beteiligt (Endo *et al.*, 2002; Glavic *et al.*, 2004). Anschließend bewirkt es auch im peripheren Nervensystem einen irreversiblen „Switch“ von der Differenzierung in autonome oder sensorische Neuronen zur Differenzierung in Schwannzellen (Morrison *et al.*, 2000; Wakamatsu *et al.*, 2000) und spielt eine Rolle bei der Entwicklung einiger anderer Neuralleistenderivate (siehe 2.3.5.1).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte, übereinstimmend mit den beschriebenen Notch-Effekten, gezeigt werden, dass sich sowohl die mRNA-Expression des Gliamarkers *GFAP* als auch der Anteil an GFAP-positiven Zellen in FACS-Experimenten nach Notch1-Aktivierung erhöhte. Die mRNA-Expression des neuronalen Vorläufermarkers *Tubb3* und der Anteil an *Tubb3*-positiven Zellen wurden dagegen durch Notch1-Aktivierung verringert. Diese beiden Effekte konnten durch Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivierung von Notch1 auch in dem hier verwandten Differenzierungssystem zu einer Förderung der Gliogenese und zur Inhibition der Neuronendifferenzierung führte. Zusätzlich dazu zeigte die Analyse der mRNA-Expression der Differenzierungsmarker *Oct4*, *Nestin*, *Sox2*, *Pax6*, *Foxd3* und *Id3*, dass Notch1 die neurale Differenzierung zu Beginn beschleunigte. Die Expressionen von

Nestin, *Sox2*, *Snai1*, *Snai2* und *Id3* deuteten darauf hin, dass durch die Notch1-Aktivierung mehr unreife neurale Stamm- und Vorläuferzellen gebildet wurden und diese auch länger erhalten wurden. Zusätzlich dazu zeigte die Analyse der mRNA-Expression von *Snai1*, *Snai2* und *Foxd3*, dass Notch1 die Bildung und Erhaltung von unreifen Neuralleistenzellen förderte. In FACS-Analysen, die gegen Ende des untersuchten Differenzierungszeitraumes durchgeführt wurden, konnte die Notch-Funktion der Erhaltung von Stammzellcharakter durch die Marker *Nestin* und *Sox2* nicht mehr zweifelsfrei nachgewiesen werden, da der Anteil der positiven Zellen für diese beiden Marker nur unter bestimmten Bedingungen zunahm. Im Fall von *Sox2* lässt sich diese Zunahme auch mit einer Zunahme von Gliazellen erklären und für *Nestin* muss bedacht werden, dass es sich um ein direktes Notch1-Zielgen handelt, was bedeutet, dass *Nestin* möglicherweise direkt aktiviert wird und damit nicht mehr als Marker von unreifen neuronalen Zellen interpretiert werden kann. Zusätzlich wurde die Morphologie der Zellen während der neuronalen Differenzierung untersucht. Sie zeigte in dem eingesetzten Differenzierungssystem ohne Notch1-Aktivierung eine für die neurale Differenzierung typische Zelltypentwicklung mit Rosetten und Axonen. Damit korreliert die beobachtete Zellmorphologie mit bekannten Differenzierungsverläufen aus der Literatur (Ying *et al.*, 2003; Lowell *et al.*, 2006; Stavridis *et al.*, 2007; Stavridis *et al.*, 2010). Durch die Aktivierung von Notch1 veränderte sich die Morphologie der Zellen vom Anfang der Differenzierung an sehr drastisch. Es befanden sich viel mehr große, flache Zellen in den Kulturen, die offensichtlich über ein höheres Migrationspotential verfügten. Zusätzlich dazu bildeten sich „neuronale Cluster“ mit kleinen Rosetten und bipolaren Zellen, die neuronalen Stammzellen ähnelten. In diesen Kulturen waren ausschließlich die „neuronalen Cluster“ positiv für *Tubb3*, wobei es etwa doppelt so viele Bereiche mit GFAP-positiven Zellen gab wie in den Kulturen ohne Notch1-Aktivierung. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit vorgefundene Morphologie der großen, flachen Zellen wurde in einer anderen Studie, in der das gleiche Differenzierungsprotokoll verwandt wurde nicht beobachtet (Lowell *et al.*, 2006). Lowell und Kollegen setzten allerdings eine ganz andere Art der Notch-Aktivierung ein. Sie brachten den intrazellulären Teil von Notch (NICD) in den *ROSA26*-Lokus ein, wodurch er ubiquitär in moderater Konzentration konstitutiv exprimiert wurde. Hier fanden sich nach Differenzierungsinduktion lediglich bipolare Zellen, die früher entstanden als in Kontrollzellen und auch schneller neural differenzierten. Flache Zellen, die sich über die gesamte Fläche verteilten, wurden bei konstitutiver starker Überexpression von Notch ausgehend vom pPyCAGIP-Vektor beobachtet (Lowell *et al.*, 2006). Diese starben aber nach wenigen Tagen und wurden nicht weiter untersucht, was darauf schließen lässt, dass die verwandten 46C embryonalen Stammzellen durchaus in der Lage dazu sind, diesen Zelltyp zu bilden. In Zellen, in denen Notch ausgehend vom *ROSA26*-Lokus nur moderat überexprimiert wurde, wurden diese nicht beschrieben. Durch die konstitutive Expression von NICD in der Studie von Lowell und Kollegen

wurden die Zellen bereits vor ihrem Einsatz in Differenzierungsexperimenten auf ES-Zellen selektiert, die trotz der kontinuierlichen Notch1-Aktivierung weiter kultiviert werden konnte. Die Entwicklung einiger Zellpopulationen sowie die Differenzierung in andere Zelltypen wurde möglicherweise schon vor Beginn der gezielten Differenzierung durch die stattgefundene Selektion induziert. Das für diese Arbeit eingesetzte NERT-Konstrukt wird erst durch die Zugabe von OHT aktiviert. Die undifferenzierten embryonalen Stammzellen werden also nicht durch eine konstitutive Aktivität von Notch vorselektiert und können sich damit vermutlich wie die parentalen Kontrollzellen in alle Zelltypen des Nervensystems entwickeln.

Der Unterschied der Notch-Aktivierung könnte auch die Erklärung für eine weitere Diskrepanz zwischen der Studie von Lowell und Kollegen und dieser Doktorarbeit sein. Lowell und Kollegen finden, konsistent mit anderen Studien (Gaiano *et al.*, 2000; Ramasamy und Lenka, 2010), eine schnellere Differenzierung von embryonalen Stammzellen in neuroepitheliale und neuroektodermale Zellen, die allerdings auch nach drei Wochen nicht beginnen, Richtung Gliazellen zu differenzieren, sondern in diesem undifferenzierten Stadium gehalten werden. In dieser Doktorarbeit wurde ebenfalls eine schnellere neurale Differenzierung durch die Aktivierung von Notch beobachtet. Diese Zellen beginnen allerdings nach etwa 12 Tagen in Richtung Gliazellen auszdifferenzieren. Hier könnte sich ebenfalls die unterschiedliche Art der Notch-Aktivierung bemerkbar machen, die möglicherweise dazu führt, dass Lowell und Kollegen genau die Zellen, die sich in den Kulturen, die in dieser Doktorarbeit untersucht wurden, in großer Zahl bildeten, durch Selektion vorher verlieren. Aber auch die Zelldichte spielt eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Differenzierung. Schon eine leichte Erhöhung kann beispielsweise zu einer starken Inhibierung der neuronalen Differenzierung führen (Ying und Smith, 2003). Die für diese Arbeit eingesetzte Zelldichte war ungefähr fünffach geringer als die in der Studie von Lowell und Kollegen verwandte (Lowell *et al.*, 2006). Der Erfolg der Differenzierung richtet sich aber nicht ausschließlich nach der ausgesäten Zelldichte, sondern vor allem nach der Entwicklung der Zelldichte im Verlauf der Differenzierung. Hierzu wurden in der zuvor genannten Arbeit keine detaillierten Angaben gemacht.

Dass Notch sowohl die Differenzierung in Gliazellen fördert als auch die Differenzierung in Neuronen inhibiert aber auch neurale Vorläuferzellen in ihrem undifferenzierten Zustand erhält, ist durch verschiedene Studien belegt (Grandbarbe *et al.*, 2003; Lowell *et al.*, 2006; Bolos *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007; Cau und Blader, 2009). Die häufig gestellte Frage ist, wie Notch die Funktionen der Gliazellförderung und der Erhaltung von neuralem Stammzellcharakter miteinander vereinbaren und regulieren kann. Die Daten in dieser Doktorarbeit ergaben eine Verstärkung von beidem durch Notch1-Aktivierung: die Zellen exprimierten über den gesamten Zeitraum der Differenzierung Marker für unreife neurale Zellen des zentralen oder peripheren Nervensystems wie *Nestin*, *Id3*, *Sox2*, *Foxd3*, *Snai1* und *Snai2*. Gleichzeitig begannen sie aber

gegen Ende der Differenzierung den Gliamarker *GFAP* und *Sox2*, das sowohl in neuronalen Stammzellen als auch in Gliazellen vorkommt, zu exprimieren. Vor allem bei Betrachtung der Auswirkungen der transienten Notch1-Aktivierung wird erkennbar, dass die Expression der Differenzierungsmarker für unreife neurale Zellen gegen Ende der Differenzierung abnahm und die von *GFAP* und *Sox2* stark anstieg. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der beiden Notch1-Effekte zeitlich erfolgt, das heißt, dass die Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien unterschiedlich auf eine Notch-Aktivierung reagieren. Während die Aktivierung am Anfang der Differenzierung zu einer schnelleren neuroepithelialen Differenzierung führt, behalten die radialen Gliazellen anschließend ihren Vorläufercharakter bei vorhandener Notch-Aktivierung. Nach einer gewissen Zeit, beginnen sie jedoch trotz Notch-Aktivierung weiter zu differenzieren. Diese Differenzierung müsste in diesem Fall durch andere, zellautonome oder extrinsische, Mechanismen als den Notch-Signalweg vorangetrieben werden. Die radialen Gliazellen werden während ihrer Differenzierung zunächst durch die Aktivierung von proneuralen bHLH-Proteinen, der Inhibierung der Selbsterneuerung und der Gliogenese zu einer Entwicklung von Neuronen veranlasst (Bylund *et al.*, 2003; Sandberg *et al.*, 2005). Anschließend erfolgt der „Switch“ zur Gliogenese. Dieser „Switch“ wird unter anderem durch Notch und progliale Faktoren wie *Sox9* und die „Nuclear factor I (NFI) genes“ gefördert (Deneen *et al.*, 2006; Esain *et al.*, 2010; Rowitch und Kriegstein, 2010). Ein aktivierter Notch-Signalweg könnte also zu einem Hinauszögern der weiteren Differenzierung von radialen Gliazellen, ab einem gewissen Zeitpunkt aber zum Start der Gliogenese führen, was in einer stark verringerten Bildung von Neuronen und einem zeitlich vorgezogenen Beginn der Gliazelldifferenzierung resultieren würde. Zusätzlich zum früheren Beginn der Gliazelldifferenzierung stehen mehr radiale Gliazellen zur Differenzierung zur Verfügung, es werden also insgesamt mehr Gliazellen gebildet. Ein möglicher Mechanismus führt über NFIA. Die *NFIA*-Expression wird durch Notch, wahrscheinlich zusammen mit anderen Faktoren, aktiviert. Zuvor aktiviert Notch seine Zielgene, wie zum Beispiel *Hes1*. Es konnte gezeigt werden, dass NFIA wiederum *Hes1* direkt herunterreguliert und gleichzeitig astrozytenspezifische Gene wie *GFAP* aktiviert (Piper *et al.*, 2010). Damit würde Notch unter anderem über *Hes1* bewirken, dass die Differenzierung nicht voranschreiten kann und anschließend durch die Aktivierung von NFIA diesen Differenzierungsstopp aufheben und gleichzeitig die Differenzierung in Richtung Gliazellen vorantreiben. Wie weit die Regulation zwischen dem Notch-Signalweg und NFIA geht, ist noch nicht bekannt. Eine Regulierung von anderen Genen, die am Notch-Signalweg beteiligt sind, wie zum Beispiel *Hes5* (Ohtsuka *et al.*, 1999), *Id4* (Jeon *et al.*, 2008) und *Hey1* (Fischer *et al.*, 2004), in NFIA-Mutanten und mögliche, konservierte NFIA-Bindestellen in ihren Promotoren konnten nachgewiesen werden (Piper *et al.*, 2010).

Für die Analyse der Rolle von Notch1 während der Neurogenese wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Zeiträume der Notch1-Aktivierung gewählt: eine konstante Aktivierung über den gesamten Zeitraum der Differenzierung und eine transiente Aktivierung nur während der ersten beiden Tage der Differenzierung. Aus den Daten der konstanten versus der transienten Notch1-Aktivierung konnten folgende Schlüsse gezogen werden: Für den Neuronenvorläufermarker *Tubb3* war, vergleichbar mit den Real-Time PCR-Ergebnissen, zu beobachten, dass die Reduktion der *Tubb3*-positiven Zellen nach transientser Notch1-Aktivierung nicht so groß war wie nach konstanter Aktivierung, was darauf hindeutet, dass für eine komplette Inhibierung der Neuronenentwicklung Notch1 dauerhaft aktiviert sein muss, eine transiente Aktivierung aber bereits zu einer starken Verringerung oder Verzögerung führt. Die leichte Induktion der *Sox2*-positiven Zellen lässt sich eher nach einer transienten Notch1-Aktivierung beobachten als nach einer konstanten Aktivierung. Dies stimmte ebenfalls mit den Untersuchungen der mRNA-Expression überein. Wenn davon ausgegangen wird, dass die *Sox2*-Expression zu diesem späten Zeitpunkt der Differenzierung auf die Expression in Gliazellen zurückzuführen ist, korreliert dieses Ergebnis zusätzlich mit der *GFAP*-Expression zu diesem Zeitpunkt. Auch hier ist, zumindest auf RNA-Ebene, eine stärkere Induktion nach transientser Notch1-Aktivierung zu beobachten als nach konstanter Aktivierung, wobei der Unterschied in diesem Fall noch eindeutiger ausfällt. Die Unterschiede im Anteil der *Nestin*-positiven Zellen zwischen der transienten und konstanten Aktivierung korrelieren mit den Ergebnissen der mRNA-Expression. Die Erhöhung der *Nestin*-Expression ist bei konstanter Aktivierung signifikant bis zum Ende der Differenzierung, wohingegen eine transiente Aktivierung an Tag 14 und Tag 16 keine signifikante Änderung von *Nestin* bewirkte. Das deutet darauf hin, dass auch eine transiente Aktivierung ausreicht, um die Zellen daran zu hindern, ausdifferenzieren, dieser Effekt aber ab etwa dem Tag 14 der Differenzierung wieder abnimmt. Diese These wird auch durch Daten anderer Marker, wie zum Beispiel *Snai1*, *Snai2* oder *Id3*, die in unreifen neuronalen Zellen des peripheren oder zentralen Nervensystems exprimiert werden, unterstützt.

Insgesamt kann also gesagt werden, dass die beiden verschiedenen Aktivierungszeiträume von Notch1, entweder konstant oder nur in den ersten beiden Tagen der Differenzierung, grundsätzlich zu einer ähnlichen Tendenz in der Veränderung der Markerexpression im Vergleich zu den Proben ohne Notch1-Aktivierung führten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch Notch1 hervorgerufenen Expressionsänderungen zum großen Teil bereits während der ersten beiden Tage der Differenzierung festgelegt werden und damit die embryonalen Stammzellen bereits sehr früh für die Differenzierung in Richtung Neuroektoderm und Glia spezifiziert werden. Auch war zu beobachten, dass die transiente Aktivierung zwar die gleichen Effekte wie eine konstante Aktivierung hervorrief, diese aber gegen Ende der Differenzierung wieder abnahmen, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Wirkung der transienten Aktivierung abnahm

und die Zellen weiter differenzierten. Verglichen mit der Embryonalentwicklung *in vivo* ist die transiente Notch1-Aktivierung wahrscheinlich aussagekräftiger als die konstante, da auch *in vivo* keine dauerhafte Notch-Aktivierung stattfindet. Das Ergebnis, dass auch eine transiente Notch1-Aktivierung zu einer stärkeren Gliazelldifferenzierung und einer Inhibierung der Neuronenentwicklung führte, würde bedeuten, dass die gliale Determination der Zellen durch Notch1 bereits in sehr frühen Phasen der neuralen Differenzierung induziert wurden, was der zeitlich regulierten Kompetenz der Zellen auf Notch zu reagieren widersprechen würde. Hier stellt sich allerdings die Frage, wie gut OHT am Tag 2 der Differenzierung aus dem Medium entfernt werden konnte. OHT wurde durch mehrfache Waschschriffe ausgewaschen, allerdings muss davon ausgegangen werden, dass auch geringe OHT-Konzentrationen noch eine Wirkung haben. Auch nach Zugabe von 1 nM OHT konnte für die meisten Zielgene noch eine, wenn auch stark verringerte, Induktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, hielt die Wirkung der transienten Notch1-Aktivierung auf die Expression der meisten Marker bis mindestens Tag 8 an, was darauf hin deutet, dass Notch noch nach Tag 2 aktiviert wurde. Während dieser Zeit wurde jeden Tag das Medium gewechselt. Das bedeutet, dass möglicherweise verbleibendes OHT nach einiger Zeit auf jeden Fall unter die Konzentration von 1 nM OHT verdünnt worden wäre. Wie lange OHT noch im Medium und das NERT-Konstrukt noch im Zellkern vorhanden waren, wurde nicht untersucht. Daher kann die Frage, ob Notch1 nach Tag 2 wirklich nicht mehr aktiviert wurde, nicht abschließend geklärt werden. Eine für weitere zwei bis drei Tage anhaltende, aber verringerte Notch1-Aktivierung sollte für die Interpretation der Daten daher in Betracht gezogen werden. Wenn diese, dann immer noch kurze, transiente Aktivierung ausreichte, um die Gliazelldifferenzierung zu fördern und die Neuronendifferenzierung zu inhibieren, würde das bedeuten, dass Notch die Zellen während der ersten Tage der Differenzierung dauerhaft so verändert hat, dass sie bereits auf ein gliales Schicksal festgelegt sind. Proneurale Gene wie *Mash1*, *Neurogenin1* oder *Math1* könnten bereits stillgelegt worden sein (Cau und Blader, 2009) und die Zellen durch die Modifikation proglierer Gene wie die „Nuclear factor I (NFI) genes“ durch Chromatinmodifikationen oder die Demethylierung ihrer Enhancern bereits die Kompetenz zur glialen Differenzierung erhalten haben. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Grandbarbe und Kollegen, die Notch in murinen neuralen Stammzellen durch die Zugabe des löslichen Liganden Jagged für 3, 5 oder 24 Stunden aktivierten und herausfanden, dass eine 5-stündige Aktivierung bereits ausreichte, um die Differenzierung in Neuronen dauerhaft zu inhibieren (Grandbarbe *et al.*, 2003). Morrison und Kollegen fanden nach 24-stündiger Notch-Aktivierung in Neuralleistenstammzellen ebenfalls eine irreversible Neuroneninhibierung und zusätzlich eine Zunahme von Gliazelldifferenzierung (Morrison *et al.*, 2000). Dass die Expression von *GFAP* und *Sox2* am Ende der neuralen Differenzierung stärker nach transienter Notch1-Aktivierung ansteigt als nach konstanter

Aktivierung lässt darauf schließen, dass die kurze Aktivierung zu einer Determinierung der Zellen in Richtung Glia geführt hat, die Funktion des Aufhaltens der Differenzierung durch Notch1 aber nur unzureichend wahrgenommen werden konnte, da Notch1 nach Tag 2 nicht mehr aktiviert wurde.

Insgesamt geben die hier vorgestellten Ergebnisse Hinweise auf eine bereits in embryonalen oder spätestens neuroektodermalen Zellen stattfindende Einflussnahme von Notch1 auf die später sichtbare Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen.

5.2 Einfluss von Sox9 auf die durch Notch1 vermittelte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen und die Differenzierung in Neuralleistenzellen

Der Transkriptionsfaktor *Sox9* gehört zusammen mit *Sox8* und *Sox10* zur SoxE-Gruppe der SOX-Familie. *Sox9* hat unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung verschiedener Gewebe und Organe. Während der Entwicklung der Neuralleiste wird es sehr früh, direkt nachdem die Neuralleistenzellen am Rand der Neuralplatte spezifiziert wurden, in diesen Zellen exprimiert (Hong und Saint-Jeannet, 2005). Ektopische Expression von *Sox9* führt zur Bildung von Neuralleistenvorläuferzellen und auch bei der Migration der Neuralleistenvorläuferzellen und deren anschließendes Überleben spielt *Sox9* eine Rolle (Cheung *et al.*, 2005; Kelsh, 2006). Für die weitere Differenzierung der Derivate der Neuralleiste wird es zumeist herunterreguliert, in einigen Zelltypen, wie zum Beispiel Chondrozyten, aber später wieder exprimiert (Haldin und LaBonne, 2010). Im Huhn konnte zusätzlich gezeigt werden, dass *Sox9*-exprimierende Zellen von einer Entwicklung in Neuronen ausgeschlossen sind, sich aber in Zellen mit glia- oder melanozytentypischen Eigenschaften entwickeln (Cheung und Briscoe, 2003). Im zentralen Nervensystem spielt *Sox9* eine essentielle Rolle in der Gliogenese. Seine Expression startet kurz vor der Gliogenese in neuralen Vorläuferzellen des Rückenmarks und bleibt während der Oligodendrozytendifferenzierung bis zum Stadium der Oligodendrozytenvorläufer erhalten, muss aber für die weitere Differenzierung herunterreguliert werden. In der Astrozytenentwicklung bleibt die *Sox9*-Expression bis zu ausgereiften adulten Astrozyten erhalten (Stolt und Wegner, 2010). Konditionale Deletionsexperimente deuten darauf hin, dass *Sox9* für die Spezifizierung von Gliazellen verantwortlich ist. Sein Ausschalten führt zu einer Reduktion von spezifizierten Oligodendrozyten und Astrozyten und zur gleichzeitigen Überproduktion von Motorneuronen und V2-Interneuronen, was darauf schließen lässt, dass *Sox9* in die Zelllinienentscheidung zwischen Motorneuronen und Oligodendrozyten beziehungsweise Astrozyten und V2-Interneuronen eingreift (Stolt *et al.*, 2003). Zusätzlich zu seiner Rolle während der Gliogenese nimmt *Sox9* Funktionen bei der Induktion und der Erhaltung von neuralen Stammzellen wahr. Seine Induktion

ist ausreichend und notwendig, um die Bildung von neuronalen Stammzellen sowohl im embryonalen als auch im adulten zentralen Nervensystem der Maus *in vivo* zu initiieren (Scott *et al.*, 2010). Diese Funktionen von Sox9 überlappen mit denen von Notch. Notch begünstigt die Produktion und Erhaltung von neuronalen Stammzellen, es fördert die Differenzierung in Gliazellen und in Neuralleistenzellen und inhibiert die in Neuronen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Sox9 während der durch Notch1 beeinflussten Linienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen sowie auf die Erhaltung von Stamm- und Vorläufercharakter und auf die Differenzierung in Neuralleistenzellen untersucht. Dazu wurde gleichzeitig Notch1 aktiviert und sein direktes Zielgen *Sox9* durch den Einsatz von spezifischer siRNA herunterreguliert (siehe 2.7.3). Anschließend wurden die durch Notch1-Aktivierung erzielten Effekte und insbesondere ihre Änderung durch das Herunterregulieren von *Sox9* ausgelesen. Auf diese Art und Weise konnte festgestellt werden, für welche Notch1-Effekte *Sox9* eine Rolle spielt (siehe 4.2.4 und 4.2.5). Wie bereits dargestellt, führte die Aktivierung von Notch1 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene zu mehr GFAP-Expression, weniger Tubb3-Expression und erhöhter Expression von Nestin und Sox2. Auf RNA-Ebene konnte zusätzlich eine deutliche Erhöhung der Expression von Neuralleistemarkern beobachtet werden. Durch die zusätzlich zur Notch1-Aktivierung durchgeführte Herunterregulierung von *Sox9* konnte kein Einfluss auf die Erhaltung von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Die Zunahme der GFAP-positiven Zellen durch Notch1 hingegen konnte durch die Herunterregulierung von Sox9 deutlich revertiert werden und nach einer transienten Aktivierung von Notch durch 50 nM OHT wurde zusätzlich die Reduktion des Anteils an Tubb3-positiven Zellen leicht revertiert. Das bedeutet, dass die durch Notch1 geförderte Differenzierung in Gliazellen und zum Teil auch die Inhibition der Neuronendifferenzierung durch Sox9 reguliert wurde (zusammengefasst in Abbildung 5.2).

Wie bereits unter 4.2.4 diskutiert, konnte ein Effekt von Sox9 auf die neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen nicht nachgewiesen, aber auch keineswegs ausgeschlossen werden. Da bekannt ist, dass Sox9 bereits in neuroepithelialen Zellen exprimiert ist und es die Bildung von neuronalen Stammzellen induziert und diese anschließend erhält (Scott *et al.*, 2010; Stolt und Wegner, 2010) und diese Funktion mit der von Notch übereinstimmt, ist es wahrscheinlich, dass Sox9 zumindest an der Vermittlung dieser Notch-Funktion beteiligt ist. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit nur jeweils ein einziges Notch1-Zielgen untersucht. An der Induktion von neuronalen Stammzellen und deren Selbsterneuerung ist aber eine Vielzahl von weiteren Faktoren beteiligt. Es ist daher möglich, dass die Funktion, die Sox9 während dieser Entwicklung einnimmt, bei dessen Herunterregulierung durch andere Faktoren übernommen und ausgeglichen wird. Ein Einfluss von Sox9 auf die durch Notch1 induzierte Verstärkung der Gliazelldifferenzierung hingegen konnte in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden. Da Sox9 am Anfang der Differenzierung herunterreguliert

wurde, und die Expression dadurch lediglich für fünf Tage erniedrigt werden konnte, bedeutet dies, dass die durch Notch1 bereits am Anfang der Differenzierung erfolgte Induktion der Gliogenese maßgeblich durch Sox9 reguliert wurde (Abbildung 5.1). Es ist erstaunlich, dass dieser deutliche Effekt auf die Gliogenese durch die Herunterregulierung eines einzigen Gens, *Sox9*, erreicht werden konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass Sox9 der entscheidende Faktor ist, durch den die Förderung der Gliogenese von Notch1 vermittelt wird. Diese Funktion kann offensichtlich nicht durch die Expression anderer Gene ausgeglichen werden. Man könnte erwarten, dass zum Beispiel entweder Sox8 oder Sox10 die Funktion von Sox9 übernehmen, da beide zum Teil redundant zu Sox9 sind (Stolt *et al.*, 2005; Finzsch *et al.*, 2008). Da die Reversion der Notch1 induzierten Zunahme der GFAP-positiven Zellen zum Teil nicht komplett durch die Herunterregulierung von Sox9 revertiert werden konnte, ist es möglich, dass ein Teil der Sox9-Funktion durch einen dieser beiden Faktoren übernommen wurde. Diese inkomplette Reversion trat allerdings nur nach konstanter und nicht nach transienter Notch1-Aktivierung auf. Das bedeutet, dass Notch1 sowohl nach den ersten beiden Tagen als auch nach Abklingen der Wirkung der *Sox9*-siRNA nach fünf Tagen noch aktiviert wurde. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Determinierung der Zellen in Gliazellen noch nach Tag 5 über Sox9 oder andere Faktoren erfolgte. Deneen und Kollegen zeigten, dass NFIA („Nuklear factor I A“) notwendig und ausreichend ist, um die Gliogenese in neuronalen Stammzellen zu initiieren. NFIA arbeitet mit Notch zusammen und seine Herunterregulierung reguliert auch Sox9 herunter, was zu der Annahme führt, dass NFIA Sox9 reguliert (Deneen *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Notch die Expression von NFIA induziert, welches wiederum die Demethylierung der STAT3 Bindestellen im *GFAP*-Promotor bewirkt und damit die Gliogenese fördert und gleichzeitig Hes1 herunterreguliert, womit der durch Notch ausgelöste Differenzierungsstopp inhibiert wird (Namihira *et al.*, 2009; Piper *et al.*, 2010). Daraus könnte man schließen, dass Notch Sox9 über NFIA reguliert. Die vorliegende Doktorarbeit und eine weitere Veröffentlichung aus unserem Labor (Meier-Stiegen *et al.*, 2010) haben jedoch gezeigt, dass *Sox9* ein direktes Zielgen von Notch1 ist. Das Ausschalten von NFIA führt zu einer verzögerten neuronalen und glialen Differenzierung, da der Notch-Signalweg nicht inhibiert wird (Piper *et al.*, 2010). Die zusätzliche Inhibierung des Notch-Signalweges durch einen γ -Sekretase-Inhibitor führt zu noch weniger *GFAP*-Expression, was bedeutet, dass Notch die Gliogenese nicht ausschließlich über NFIA fördert. Es ist daher möglich, dass *Sox9* ein direktes Zielgen von Notch ist und zusätzlich, direkt oder indirekt, durch NFIA reguliert wird. Eine Herunterregulierung von *Sox9* würde die Induktion der Gliogenese durch beide Wege inhibieren. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass NFIA die Gliogenese nicht ausschließlich über Sox9 aktiviert. Es bindet zum Beispiel zusätzlich an den *GFAP*-Promotor und bewirkt dessen Demethylierung, so dass er anschließend durch STAT3 aktiviert werden kann (Namihira *et al.*, 2009). Dass die

Herunterregulierung von *Sox9* trotzdem dazu in der Lage ist, die Notch induzierte Förderung der Gliogenese zu verhindern, lässt vermuten, dass Sox9 eine zentrale Rolle in der Regulation dieser Prozesse spielt.

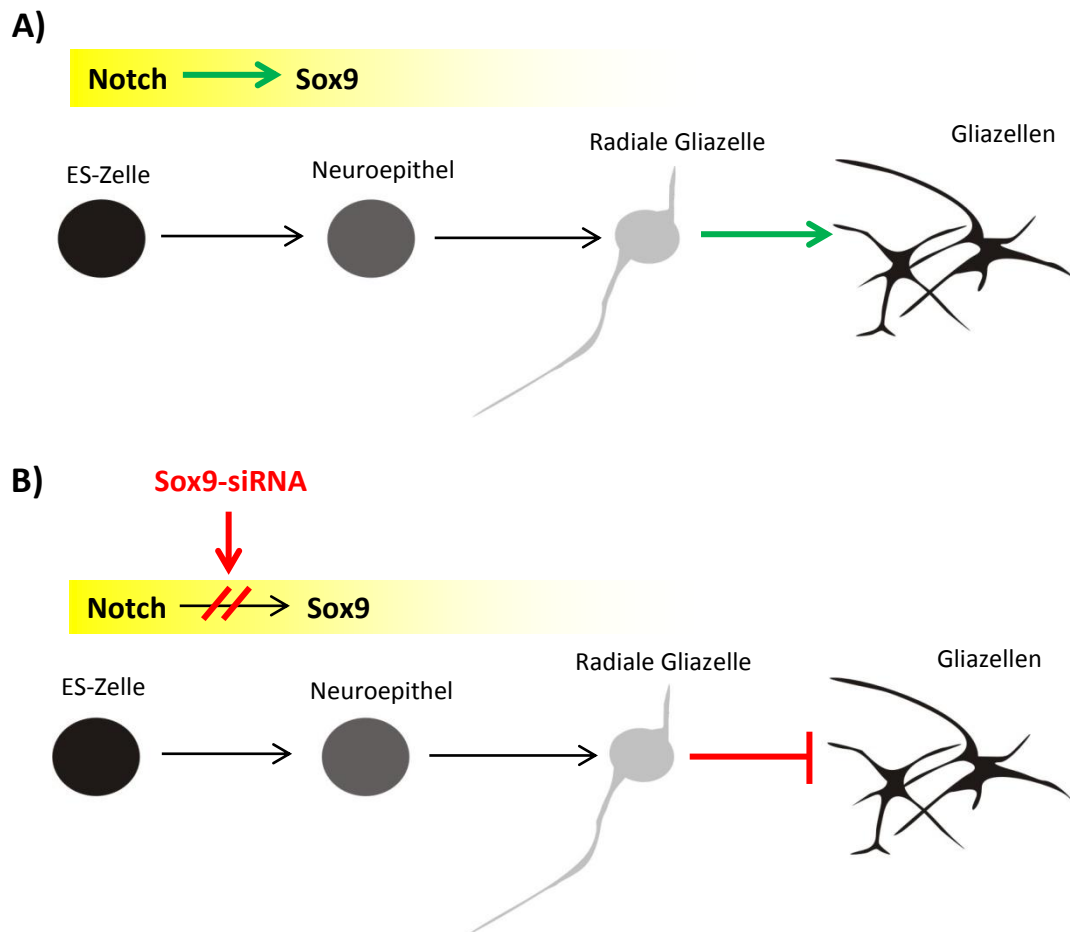


Abbildung 5.1 Die Regulation der Notch1-vermittelten Förderung der Gliogenese durch Sox9

A) Durch die Aktivierung von Notch1 (gelb) und der damit einhergehenden Induktion von Sox9 zu Beginn der neuralen Differenzierung konnte eine verstärkte Bildung von Gliazellen induziert werden.

B) Diese durch Notch1 hervorgerufene Förderung der Gliogenese wurde durch die Herunterregulierung von Sox9 durch *Sox9*-siRNA ebenfalls zu Beginn der neuralen Differenzierung aufgehoben.

Nach einer transienten Notch1-Aktivierung durch 50 nM OHT ließ sich zusätzlich ein Effekt von Sox9 auf den Notch1-Effekt der Inhibition der neuronalen Differenzierung beobachten. Ob Sox9 maßgeblich an der durch Notch1 induzierten Inhibition der neuronalen Differenzierung beteiligt ist oder ob dies ein sekundärer Effekt der durch Sox9 geförderten Gliogenese ist, ist indes nicht klar. Die Herunterregulierung von *Sox9* war nur unter einer der drei möglichen Bedingungen dazu in der Lage, die Inhibition der Neuronendifferenzierung zum Teil zu revertieren. Dies könnte darauf hin deuten, dass ein ungünstiger Zeitpunkt für die Untersuchung der Inhibition der Neurogenese gewählt wurde. Es könnte aber auch sein, dass Sox9 nur indirekt daran beteiligt ist,

indem es aktiv die Gliogenese fördert und damit möglicherweise die Differenzierung in Neuronen behindert oder verringert. Stolt und Kollegen fanden heraus, dass Sox9 die Bildung von Oligodendrozyten aus der pMN-Vorläuferdomäne des Rückenmarks auf Kosten der Bildung von Motorneuronen fördert und ektopische Expression von Sox9 *in vitro* zur Herunterregulierung der neuronalen Gene *AMPA Rezeptor* und *Calbindin D₂₈* führt, was auf eine direkte Repression der neuronalen Differenzierung hinweist (Stolt *et al.*, 2003). Das proneurale Gen *Mash1* wird in Ganglien des sympathischen Nervensystems, nicht aber im Rückenmark von Sox9-defizienten Embryonen reprimiert (Cheung *et al.*, 2005). Ob dies allerdings direkte Zielgene von Sox9 sind, wurde nicht untersucht. Es ist auch möglich, dass andere Faktoren auf die durch Notch1 induzierte Inhibition der neuronalen Differenzierung, wie zum Beispiel proneurale Gene wie *Mash1* und *Math1*, deren Expression durch die Deletion von Notch erhöht wird (Lutolf *et al.*, 2002), unabhängig von Sox9 Einfluss nehmen.

Zusätzlich zum murinen Rückenmark (Taylor *et al.*, 2007), gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Notch und Sox8 und Sox9 bei der Entwicklung von Müller Gliazellen in der Retina. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl Sox8 als auch Sox9 für die Müller Gliazelldifferenzierung notwendig sind, beide aber nicht ausreichen, um diese Differenzierung zu initiieren (Muto *et al.*, 2009). Außerdem wurden beide durch Notch-Aktivierung induziert und durch die Inhibition von Notch durch den Inhibitor DAPT zum Teil reprimiert. Hier wurde allerdings nicht untersucht, ob Sox9 ein direktes Zielgen von Notch ist und auch nicht, ob die Differenzierung der Müller Gliazellen von Notch über Sox8 oder Sox9 reguliert wird. Trotzdem unterstützen diese Ergebnisse die in der vorliegenden Arbeit gezogenen Schlussfolgerungen und deuten darauf hin, dass Notch seine Funktion während der Gliogenese in verschiedenen Geweben über Sox9 reguliert.

Wie bereits erwähnt, reicht bereits eine zweitägige transiente Notch1-Aktivierung am Anfang der Differenzierung aus, um die spätere Gliogenese zu fördern. Aus den hier erhaltenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass auch Sox9 zu diesem Zeitpunkt Einfluss auf diesen Notch1-Effekt nimmt. Der Mechanismus durch den dies geschehen könnte, ist nicht bekannt. Andere Studien haben jedoch eine ähnlich frühe Expression von Sox9 einige Zeit vor dem anschließend durch Sox9 beeinflussten Ereignis gezeigt. Während der Entwicklung von Chondrozyten, auf die Sox9 einen entscheidenden Einfluss hat, wird es bereits lange vor deren Entstehung im Mesoderm exprimiert (Bi *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2002). Auch während der männlichen Geschlechtsdeterminierung wird Sox9 exprimiert bevor sein Einfluss sichtbar wird (Kent *et al.*, 1996). Dies könnte auf einen konservierten Mechanismus, den Sox9 bei der Vermittlung seiner Funktion in verschiedenen Geweben nutzt, hindeuten. Dieser Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Sox9 kann durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, SUMOylierung oder Ubiquitynierung reguliert werden. Außerdem arbeitet es unter anderem mit

Sox5 und Sox6 zusammen, um Zielgene, wie zum Beispiel *Col2A* während der Chondrogenese zu aktivieren (Furumatsu und Asahara, 2010). Wie es allerdings die Förderung der Gliogenese erreicht, ist unklar.

Ein Faktor, durch den Sox9 die Gliogenese regulieren könnte, ist Sox10. Es wird durch Sox9 in der Neuralleiste, im Ektoderm und im Neuralrohr direkt aktiviert (Cheung und Briscoe, 2003; Stolt *et al.*, 2003; Betancur *et al.*, 2010). Die *Sox10*-Expression beginnt in Neuralleistenzellen vor ihrer Migration und wird weiterhin in den meisten migrierenden Neuralleistenzellen erhalten (Kelsh, 2006). Hier inhibiert es die neuronale Differenzierung und verhindert Apoptose (Kim *et al.*, 2003). Sein Ausschalten führt zum kompletten Verlust aller Gliazellen des peripheren Nervensystems (Stolt und Wegner, 2010). Im zentralen Nervensystem wird Sox10 in Oligodendrozyten exprimiert und ist für ihr Ausreifen erforderlich (Stolt und Wegner, 2010). Es ist also möglich, dass Sox9 über die Aktivierung von Sox10 die Differenzierung in Gliazellen des peripheren Nervensystems und in Oligodendrozyten induziert. Da bisher keine Rolle von Sox10 in der Astrogliogenese beschrieben worden ist, ist unwahrscheinlich, dass diese Differenzierung durch Sox10 induziert wird.

Eine andere Möglichkeit, wie Sox9 seine Funktion ausüben kann, ist die Regulation anderer Signaltransduktionswege. Es ist bekannt, dass Sox9 an β -Catenin binden kann und diese Bindung zur Degradation von β -Catenin führt (Akiyama *et al.*, 2004; Topol *et al.*, 2009). Dies ermöglicht die Chondrogenese, die durch den Wnt-Signalweg inhibiert wird (Hartmann und Tabin, 2001; Guo *et al.*, 2004). Andere Differenzierungsereignisse, wie die Entwicklung der Melanozyten und die Induktion der Neuralleiste, benötigen allerdings einen aktiven Wnt-Signalweg (Taylor und LaBonne, 2007). Während der Induktion der Neuralleiste in *Xenopus* ist die Aktivität des Wnt-Signalweges abhängig von der Anwesenheit von Sox9. Die Regulation des Wnt-Signalweges und möglicherweise anderer Signaltransduktionswege durch Sox9 muss also kontextabhängig sein, stellt aber einen möglichen Mechanismus dar, durch den die Gliogenese über Sox9 gefördert werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die gliale Determinierung durch Notch1 über Sox9 lange Zeit vor dem Einsetzen der eigentlichen Gliogenese stattfindet. Dies lässt eine Wirkung von Sox9 über zum Beispiel Chromatinmodifikationen oder Demethylierungen von Promotoren oder Enhancern wahrscheinlich erscheinen. Während der Regulation der Chondrogenese durch Sox9 konnte bereits gezeigt werden, dass Sox9 an Histonacetylierungen beteiligt ist und diese die transkriptionelle Aktivierung seiner Zielgene verstärkt (Tsuda *et al.*, 2003; Furumatsu *et al.*, 2005). Diese und andere epigenetische Modifikationen könnten die Zellen zwar determinieren und ihnen damit die Differenzierung in Gliazellen erlauben und in Neuronen versagen, die eigentliche Differenzierung müsste aber nicht sofort einsetzen.

Neben dem Einfluss von Notch1 auf die Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Notch1 zu einer erhöhten Expression von Neuralleistenmarkern führte (siehe 4.1.3.4). Da Sox9 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Neuralleiste spielt, lag die Vermutung nahe, dass Notch1 die Induktion der Expression der Neuralleistenmarker über die Induktion des direkten Zielgens *Sox9* hervorruft. Daher wurde die bereits verwandte siRNA-Strategie auch eingesetzt, um die Rolle von Sox9 für die Neuralleistendifferenzierung zu untersuchen (siehe 4.2.5). Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Reversion der durch Notch1 bedingten Induktion der Marker *Snai1* und *Snai2* durch die Herunterregulierung von *Sox9* nicht erfolgte. Die sehr leichte Reversion der Reduktion der *Foxd3*-Expression am Anfang der Differenzierung deutet wahrscheinlich eher auf einen leichten Einfluss von Sox9 auf die zu diesem Zeitpunkt noch in der Kultur vorhandenen *Foxd3*-positiven embryonalen Stammzellen hin. Dies würde bedeuten, dass die Induktion von Sox9 durch Notch1 zu einer schnelleren neuralen Differenzierung von embryonalen Stammzellen beiträgt. Dies korreliert mit seiner Funktion, die Bildung von neuralen Stammzellen zu induzieren (Scott *et al.*, 2010). Da die Reversion dieses Notch1-Effektes allerdings nur sehr gering war, kann davon ausgegangen werden, dass entweder andere redundante Faktoren die Rolle von Sox9 bei seiner Herunterregulierung übernommen haben oder dass Sox9 nicht alleine die schnellere Differenzierung von embryonalen Zellen am Anfang der neuralen Differenzierung vermittelt. Die aber immerhin signifikante Reversion der *Foxd3*-Expression lässt darauf schließen, dass Sox9 zumindest an der Regulation dieses Notch1-Effekts beteiligt ist.

Die Reversion der durch Notch1 bedingten Induktion der *Id3*-Expression könnte entweder auf einen Einfluss von Sox9 auf die Entwicklung der Neuralleiste oder auf die Entwicklung von neuralen Stammzellen hindeuten, da *Id3* in diesen beiden Populationen exprimiert wird. Ein weiterer Marker für neurale Stammzellen, Sox2, wurde an Tag 14 der neuralen Differenzierung in FACS-Analysen betrachtet und dort konnte kein Einfluss von Sox9 festgestellt werden. Die Expression von *Id3* wurde allerdings während der ersten sechs Tage der Differenzierung analysiert. Es ist möglich, dass ein Einfluss von Sox9 auf die *Sox2* oder *Nestin*-Expression zu diesem Zeitpunkt sichtbar war, aber nicht untersucht wurde. Scott und Kollegen konnten zeigen, dass Sox9 neurale Stammzellen im embryonalen und adulten zentralen Nervensystem induziert und erhält (Scott *et al.*, 2010). Da diese Funktion mit der von Notch übereinstimmt, ist es wahrscheinlich, dass Sox9 an der Vermittlung dieser Funktion beteiligt ist.

Es ist allerdings auch für verschiedene Spezies bekannt, dass Sox9 an der Spezifizierung der Neuralleiste mitwirkt (Haldin und LaBonne, 2010). Die beiden Marker für Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) *Snai1* und *Snai2*, die während der Delamination der Neuralleistenzellen exprimiert werden und für das Überleben von Neuralleistenzellen erforderlich sind, wurden durch die Herunterregulierung von Sox9 nicht beeinflusst. Dies ist erstaunlich, da

beschrieben wurde, dass Sox9 die Expression von *Snail* induziert (Cheung und Briscoe, 2003). Alleine die durch Sox9-Herunterregulierung veränderte Expression von *Id3* könnte auf einen Einfluss von Sox9 auf die durch Notch1 hervorgerufene Induktion der Neuralleiste hinweisen. Dieser Marker wird aber, wie bereits erwähnt, auch in neuronalen Stammzellen des zentralen Nervensystems exprimiert und kann daher nicht nur als Neuralleistenmarker interpretiert werden. Insgesamt konnte mit Hilfe dieses „Readouts“ eine entscheidende Rolle von Sox9 auf die durch Notch1 induzierte vermehrte Expression von Neuralleistenmarkern nicht nachgewiesen werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass das Ausschalten oder Herunterregulieren eines einzigen Gens wie Sox9 durch Redundanzen anderer Faktoren ausgeglichen werden könnte. Es ist zum Beispiel bekannt, dass Sox8, Sox9 und Sox10 teilweise die Funktionen füreinander übernehmen können (Kelsh, 2006; Haldin und LaBonne, 2010; Stolt und Wegner, 2010). Sox8 ersetzt Sox9 teilweise bei der Spezifizierung von Gliazellen (Stolt et al., 2005) und sowohl Sox9 als auch Sox10 aktivieren den PDGF Rezeptor α in Oligodendrozytenvorläuferzellen des murinen Rückenmarks und können sich dabei gegenseitig ersetzen (Finzsch et al., 2008). Zusätzlich dazu fanden Cheung und Kollegen heraus, dass Sox9 nur zusammen mit Foxd3 und Snail eine effektive Induktion der Neuralleistenzellen bewirkt (Cheung et al., 2005). In Abwesenheit von Sox9 wurden Neuralleistenzellen in Mausembryonen ebenfalls spezifiziert, starben aber kurz darauf. Jeder dieser Transkriptionsfaktoren konnte alleine lediglich einige Eigenschaften von Neuralleistenzellen induzieren. Sox9 beispielsweise bewahrte Zellen, die gerade eine EMT durchliefen, vor der Apoptose, konnte diese EMT alleine aber nicht induzieren. Nur zusammen waren sie dazu in der Lage, die Bildung von Zellen zu initiieren, die sowohl auf morphologischer als auch auf transkriptioneller Ebene alle Eigenschaften von Neuralleistenzellen besaßen. In den Versuchen dieser Arbeit wurde nur die Notch1 induzierte Expression von Sox9 durch siRNA herunterreguliert. Es wurde aber nicht ausgeschaltet. Die verbleibende Expression könnte zusammen mit den anderen Faktoren ausreichen, um die Bildung von Neuralleistenzellen zu induzieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Notch1 die gliale Determinierung während der Neurogenese bereits ganz am Anfang in embryonalen Stammzellen, neuroepithelialen Zellen oder radialen Gliazellen/ neuronalen Stammzellen induziert und dass diese Induktion durch den Transkriptionsfaktor Sox9 vermittelt wird. Außerdem konnte eine Beteiligung von Sox9 an der durch Notch1 induzierten Beschleunigung der Entwicklung von neuronalen Zellen zu Beginn der Differenzierung festgestellt werden (zusammengefasst in Abbildung 5.2).

Notch beschleunigt die neurale Differenzierung am Anfang, trägt zur Erhaltung von radialen Gliazellen/neuralen Stammzellen bei und wirkt zusätzlich fördernd auf die Bildung von radialen Gliazellen/neuralen Stammzellen, Neuralleistenvorläuferzellen und Gliazellen des peripheren und zentralen Nervensystems (grüne Pfeile). Außerdem führt seine Aktivierung zur Inhibition der Differenzierung in Neuronen (rote Pfeile). Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte nachgewiesen werden, dass Sox9 die durch Notch1 induzierte Förderung der Gliogenese reguliert und eine Rolle bei der durch Notch1 vermittelten beschleunigten Entwicklung von frühen neuroektodermalen Zellen spielt. Zusätzlich ist es möglicherweise an der Inhibition der Neuronendifferenzierung, der Spezifizierung von Neuralleistenzellen und der Erhaltung von radialen Gliazellen/neuralen Stammzellen beteiligt (mit ? gekennzeichnet).

5.3 Einfluss von Pax6 auf die durch Notch1 vermittelte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen

Der Transkriptionsfaktor *Pax6* (*paired box 6*) spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystem und pankreatischen Inselzellen (St-Onge *et al.*, 1997). Pax6-Mutanten haben unter anderem Defekte in der Proliferation von neuralen Stamm- und Vorläuferzellen, der Neurogenese, der Produktion von spezifischen Neuronentypen und in der Musterbildung des Neuralrohrs (Osumi *et al.*, 2008). *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass die Überexpression von *Pax6* in embryonalen Stammzellen ihre Differenzierung in neuroepitheliale Vorläuferzellen fördert. Weitere Überexpression von *Pax6* in neuropithelialen Vorläuferzellen führt zu fortschreitender Differenzierung in radiale Gliazellen, vermehrter Bildung von Neuronen und verstärkter Migration von jungen Neuronen aus Vorläuferzellenkolonien heraus, während der Knockdown von *Pax6* in neuroepithelialen Zellen die weitere Differenzierung in radiale Gliazellen reprimiert (Suter *et al.*, 2009). *In vivo* Untersuchungen deuten darauf hin, dass Pax6 für die Erhaltung des neuralen Stammzellpools wichtig ist, die vorzeitige Differenzierung inhibiert und anschließend die Entwicklung in Neuronen fördert (Philips *et al.*, 2005; Quinn *et al.*, 2007). Es ist zusätzlich in Astrozyten und Astrozytenvorläufern exprimiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Pax6 für die neurale Spezifizierung von embryonalen Stammzellen und ihre weitere Differenzierung in radiale Gliazellen verantwortlich ist, aber auch an der Entwicklung von Neuronen aus radialen Gliazellen und an der Ausreifung von Astrozyten beteiligt ist. Ob es zur Erhaltung von neuralen Stamm- und Vorläuferzellen oder aber zu deren weiteren neuronalen Differenzierung beiträgt, ist kontext- und konzentrationsabhängig. Sansom und Kollegen konnten zeigen, dass erhöhte Pax6-Proteinlevel in der Maus zu einer verstärkten Bildung von Neuronen auf Kosten der Erhaltung des Stammzellpools führten und das Ausschalten von Pax6 die Selbsterneuerung von neuralen Stammzellen komplett inhibierte und beides damit in einem zu kleinen Gehirn mit zu wenig Neuronen resultierte (Sansom *et al.*, 2009).

Die Funktionen von Pax6 überlappen zum Teil mit denen von Notch während der embryonalen Entwicklung. Durch beide Faktoren wird die Differenzierung in neuroektodermale Zelltypen gegenüber der Differenzierung in mesodermale oder endodermale Zelltypen gefördert. Anschließend sind sowohl Notch als auch Pax6 für die Erhaltung von neuralen Stammzellen oder radialen Gliazellen wichtig. Ab diesem Punkt der neuralen Differenzierung unterscheiden sich ihre Funktionen allerdings gravierend. Während Pax6 die Spezifizierung von radialen Gliazellen in Neuronen fördert, inhibiert Notch genau diesen Differenzierungsschritt und fördert im Gegenteil die Differenzierung in Gliazellen. Diese Tatsachen spiegeln sich in der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten mRNA-Expression von *Pax6* mit und ohne Notch1-Aktivierung während der neuralen Differenzierung wieder (siehe 4.1.3.1). In den ersten beiden Tagen wurde

Pax6 durch die Aktivierung von Notch1 induziert. Diese Induktion war sowohl in embryonalen Stammzellen als auch in frühen neural differenzierten Zellen direkt (siehe 4.3.2) und korreliert mit der Induktion der neuroektodermalen Differenzierung durch sowohl *Pax6* als auch Notch1. Anschließend wurde die *Pax6*-Expression sowohl durch konstante als auch transiente Notch1-Aktivierung reprimiert. Diese Repression konnte an Tag 5 der Differenzierung als indirekte Repression identifiziert werden (siehe 4.3.2). Dies widerspricht auf den ersten Blick der *Pax6*-Funktion der Erhaltung von Stammzellcharakter, die ebenfalls durch Notch induziert wird. Andererseits ist Notch dafür bekannt, die neuronale Differenzierung zu inhibieren, *Pax6* aber dafür sie zu fördern. Diese Funktion nimmt *Pax6* aber nur bei hohen Expressionsleveln wahr, während mittlere Level zur Erhaltung von Stammzellcharakter führen (Sansom *et al.*, 2009). Daher ist die Repression von *Pax6* möglicherweise notwendig, um die Inhibition der Neuronenbildung durch Notch1 zu ermöglichen. Die dabei verbleibende *Pax6*-Expression könnte ausreichen oder sogar genau das Expressionslevel darstellen, das nötig ist, um die Funktion der Erhaltung von Stammzellcharakter wahrzunehmen. Lediglich für ein komplettes Ausschalten von *Pax6* wurde ein Auslöschen dieser Funktion nachgewiesen (Sansom *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle von *Pax6* während der durch Notch1 beeinflussten Linienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen oder während der Erhaltung von Stamm- und Vorläuferzellcharakter untersucht. Dazu wurde gleichzeitig Notch1 aktiviert und das direkte Zielgen *Pax6* durch den Einsatz von spezifischer siRNA herunterreguliert (siehe 2.7.3). Anschließend wurden die durch Notch1-Aktivierung erzielten Effekte und insbesondere ihre Änderung durch das Herunterregulieren von *Pax6* ausgelesen. Auf diese Art und Weise konnte festgestellt werden, ob *Pax6* an der durch Notch1 induzierten Förderung der Gliazelldifferenzierung oder der Erhaltung von Stamm- und Vorläuferzellcharakter beteiligt ist. Dafür wurde eine FACS-Analyse an Tag 14 der neuralen Differenzierung durchgeführt (siehe 4.3.4). Hierbei konnte nicht nachgewiesen werden, dass die gesteigerte *Pax6*-Expression am Anfang der Differenzierung für die durch Notch1 induzierte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen oder das vermehrte Auftreten von Stamm- und Vorläuferzellen eine Rolle spielt, die mit diesem „Readout“ an Tag 12 bis 14 der Differenzierung festgestellt werden kann. Wie bereits unter 4.3.4 dargestellt, fördern sowohl Notch als auch *Pax6* die Bildung von neuroepithelialen Zellen. Außerdem induziert Notch1 die Expression von *Pax6* am Anfang der neuralen Differenzierung. Es ist also möglich anzunehmen, dass die durch Notch1 begünstigte Differenzierung in neurale anstatt in mesodermale oder endodermale Zelllinien durch *Pax6* vermittelt wird oder dieser Transkriptionsfaktor zumindest daran beteiligt ist. Dies ließ sich allerdings nicht mit den im Rahmen dieser Doktorarbeit verwandten Methoden nachweisen. Das hier verwandte neurale Differenzierungssystem inhibiert bereits die Bildung von Mesoderm und Endoderm und fördert die von Ektoderm. Daher ist eine eventuell durch Notch1 oder *Pax6*

hervorgerufene vermehrte Bildung von Ektoderm unter den eingesetzten Medienbedingungen nicht möglich und kann dementsprechend nicht untersucht werden. Hierzu müsste ein Differenzierungssystem, dass eine unvoreingenommene Differenzierung aller drei Keimblätter zulässt, verwandt werden. Die verstärkte Bildung von radialen Gliazellen aus neuroepithelialen Zellen, der zweite mit Notchfunktionen vereinbare Pax6-Effekt, ließe sich innerhalb des hier verwandten Systems möglicherweise anhand der beobachteten schnelleren Differenzierung nach Notch1-Aktivierung zu Beginn der Differenzierung untersuchen. Dieser Zeitraum wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht im Zusammenhang mit Pax6 betrachtet. Der dritte Pax6-Effekt, der mit einer Notch-Funktion vereinbar ist, ist die Erhaltung von Stammzellcharakter. Möglicherweise ist die beobachtete Abnahme der *Pax6*-Expression ab Tag 4 der Differenzierung notwendig, um das Pax6-Level zu erreichen, das benötigt wird, um diese Funktion zu erfüllen. Dies lässt sich allerdings nicht mit Hilfe einer Pax6-Herunterregulierung untersuchen, da dies eine Repression noch verstärken würde. In diesem Fall müsste die Pax6-Expression im Gegenteil verstärkt werden. Da Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass die Repression durch Notch1 ein indirekter Effekt ist, stellt sich zusätzlich die Frage, durch welche Faktoren sie vermittelt wird. Um einen Einfluss von Pax6 auf diese drei Notch1-Effekte nachzuweisen, müssten weitere Untersuchungsmethoden gewählt werden. Ein Einfluss von Pax6 auf die Linienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen konnte hier ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass erstens Effekte zu anderen Zeitpunkten als dem untersuchten sichtbar werden könnten und zweitens das Ausschalten eines Faktors wie Pax6 dazu führen könnte, dass andere Faktoren seine Funktion übernehmen. Zusätzlich dazu muss bedacht werden, dass es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass Pax6 die Bildung von Gliazellen fördert. Die Ergebnisse einer Studie zeigen, dass Pax6 in murinen Astrozyten exprimiert wird und deuten darauf hin, dass es die Proliferation von Astrozytenvorläufern inhibiert und ihre Ausreifung fördert (Sakurai und Osumi, 2008). In dieser Studie wurden aber nur Astrozyten und ihre Vorläufer untersucht. Ob Pax6 in vorangegangenen Stadien Einfluss auf die Bildung oder Determinierung von Gliazellen nimmt, wurde nicht untersucht. Andere Studien zeigen, dass Pax6 die Bildung von Oligodendrozytenvorläufern aus der pMN-Domäne inhibiert und außerdem am „Switch“ von der Entwicklung der radialen Gliazellen in Neuronen zu ihrer Entwicklung in Gliazellen beteiligt ist (Sugimori *et al.*, 2007; Hochstim *et al.*, 2008; Genethliou *et al.*, 2009). Hierbei muss Pax6 herunterreguliert werden, bevor sich Astrozyten oder Oligodendrozyten entwickeln können. Dies lässt vermuten, dass der Einfluss von Pax6 auf die Linienentscheidung zwischen Gliazellen und Neuronen ein anderer als der von Notch wäre. Notch fördert die Bildung von Gliazellen (Tanigaki *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2007), Pax6 eher die von Neuronen (Osumi *et al.*, 2008). Dies lässt eine Vermittlung der Förderung der Gliogenese durch die Induktion von Pax6 in den ersten beiden Tagen der Differenzierung eher unwahrscheinlich erscheinen. Die daran

anschließende Repression von Pax6 durch Notch1 könnte dagegen an einer Inhibition der Neuronendifferenzierung beteiligt sein. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Repression indirekt erfolgt. Trotzdem gibt es Hinweise darauf, dass sie notwendig ist, um die Differenzierung in Gliazellen zu ermöglichen (Sugimori *et al.*, 2007).

Insgesamt konnte mit den im Rahmen dieser Arbeit verwandten Methoden kein Einfluss von Pax6 auf die durch Notch1 vermittelte Linienentscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen nachgewiesen werden. Ein Einfluss auf die Erhaltung von Stammzellcharakter konnte ebenfalls nicht nachgewiesen, aber auch keineswegs ausgeschlossen werden. Hier könnte ein Zusammenwirken von Pax6 mit anderen Notch1-Zielgenen, wie zum Beispiel Sox9 oder Id3, eine Rolle spielen. Eine kombinierte Herunterregulierung dieser Zielgene wäre ein Ansatz, mit dem diese Theorie überprüft werden könnte. Andere Notch1-Effekte, für die eine Regulation über Pax6 plausibel erscheint, wie die Förderung der Differenzierung in neuroektodermale Zelltypen oder die weitere Differenzierung in radiale Gliazellen, wurden noch nicht untersucht.

5.4 Einfluss von Runx1 auf die durch Notch1 vermittelte Reduktion der Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung

Runx1 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Knockout während der Embryonalentwicklung zur vollständigen Abwesenheit der definitiven Hämatopoese führt, was den Tod des Embryos zur Folge hat (Okuda *et al.*, 1996). *Runx1* wird an allen Orten der definitiven Hämatopoese vor der Bildung von definitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Zusätzlich findet sich seine Expression in einigen Endothelzellen und mesenchymalen Zellen (Swiers *et al.*, 2010). Der Notch-Signalweg spielt ebenfalls eine Rolle während der mesodermalen Entwicklung und der Hämatopoese. Er arbeitet in der Hierarchie oberhalb von Runx1 und induziert seine Expression im Zebrafisch *Danio rerio* und in murinen embryonalen Stammzellen und mesodermalen Vorläuferzellen (Burns *et al.*, 2005; Meier-Stiegen *et al.*, 2010 und diese Arbeit). Hier wurde Runx1 als direktes Notch1-Zielgen in mesodermalen Vorläuferzellen identifiziert (Meier-Stiegen *et al.*, 2010). Zusätzlich dazu ist Runx1 in der Maus dazu in der Lage, den Defekt in der Hämatopoese, der durch Notch1-Deletion verursacht wird, zu kompensieren (Nakagawa *et al.*, 2006). Außerdem ist bekannt, dass Notch1 die Bildung von Flk1-positiven mesodermalen Vorläuferzellen inhibiert (Schroeder *et al.*, 2006 und diese Arbeit). Die fötale Leberkinase Flk-1 wird in frühen Zellen des Seitenplattenmesoderms exprimiert und *Runx1*-Expression reguliert seine Expression, entweder direkt oder indirekt, herunter (Hirai *et al.*, 2005).

Dies führt zu der Vermutung, dass Notch1 die Bildung von Flk-1-positiven Zellen über die Aktivierung von *Runx1* blockiert. Um diesen möglichen Zusammenhang näher zu untersuchen,

wurden die Zellen mesodermal differenziert und der Anteil der Flk-1-positiven Zellen an Tag 5 mittels FACS-Analyse betrachtet. Wie erwartet konnte die Flk-1-positive Population durch 24-stündige Notch1-Aktivierung zu Beginn der Differenzierung deutlich reduziert werden. Gleichzeitig wurde der Einfluss von Notch1 auf die Expression von *Runx1* mithilfe eines Reportergenkonstrukts, das in CCE-embryonale Stammzellen eingefügt wurde, untersucht. Es besteht aus einer modifizierten Form des YFP (venus), das in den 5'UTR eines der beiden *Runx1*-Allele unter der Kontrolle des proximalen Promotors P2 eingefügt wurde (Hirai *et al.*, 2005). Bei einer Aktivierung des Promotors durch Notch1 wird Venus exprimiert und ist ohne weitere Färbung in FACS-Experimenten nachweisbar. Die 24-stündige Zugabe von 500 nM OHT zu Beginn der Differenzierung resultierte in einer Zunahme der Venus-positiven Zellen. In den Kontrollzellen, die nur mit dem leeren Kontrollvektor pCAG-IP transfiziert worden waren, waren diese beiden Effekte nicht sichtbar, was bedeutet, dass OHT alleine keine Auswirkungen auf die Bildung dieser beiden Populationen hatte. Diese Ergebnisse bestätigen bereits bekannte Ergebnisse aus der Literatur, die zeigen, dass Notch1 Flk-1 reprimiert und außerdem den Promotor von *Runx1* aktiviert (Hirai *et al.*, 2005; Schroeder *et al.*, 2006). Der nächste Schritt wäre die Herunterregulierung von *Runx1* mit Hilfe von siRNA und die gleichzeitige Aktivierung von Notch1. Anschließend würde der Einfluss auf die Anzahl Flk-1-positiver Zellen als „Readout“ untersucht werden. Dafür müsste zunächst der richtige Zeitpunkt für eine Herunterregulierung gefunden werden. Mit Hilfe dieser siRNA-Strategie (siehe 2.7.3) kann festgestellt werden, ob *Runx1* die durch Notch1 hervorgerufene Reduktion der Anzahl der Flk-1-positiven Zellen vermittelt. Bisher konnte keine zufriedenstellende Herunterregulierung von *Runx1*-mRNA durch *Runx1*-siRNA in *embryoid bodies* während der mesodermalen Differenzierung erzielt werden, was möglicherweise auf die dreidimensionale Struktur der *embryoid bodies* zurückzuführen ist. Dieses Problem lässt sich möglicherweise mit einem anderen, zweidimensionalen Differenzierungssystem auf Collagen lösen, in dem die Zellen räumlich leichter zugänglich für die siRNA sind. Eine andere Möglichkeit ist, die Zellen zunächst in hängenden Tropfen zu differenzieren und zu einem passenden Zeitpunkt, zum Beispiel Tag 3 oder 4 die Zellen der *embryoid bodies* zu dissoziieren und neu auszusäen, um sie anschließend mit siRNA zu transfizieren.

Insgesamt stellen die bisher erhaltenen Ergebnisse einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Analysen des Zusammenhangs zwischen Notch1, Runx1 und der Reduktion der Flk-1-positiven Zellen während der mesodermalen Differenzierung dar.

6. Literaturverzeichnis

- Aasen, T., A. Raya, M.J. Barrero, E. Garreta, A. Consiglio, F. Gonzalez, R. Vassena, J. Bilic, V. Pekarik, G. Tiscornia, M. Edel, S. Boue und J.C. Izpisua Belmonte (2008). *Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes*. Nat Biotechnol 26: 1276-1284.
- Akiyama, H., M.C. Chaboissier, R.R. Behringer, D.H. Rowitch, A. Schedl, J.A. Epstein und B. de Crombrughe (2004). *Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa*. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 6502-6507.
- Akiyama, H., M.C. Chaboissier, J.F. Martin, A. Schedl und B. de Crombrughe (2002). *The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6*. Genes Dev 16: 2813-2828.
- Anthony, T.E., C. Klein, G. Fishell und N. Heintz (2004). *Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system*. Neuron 41: 881-890.
- Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand und R.J. Lake (1999). *Notch signaling: cell fate control and signal integration in development*. Science 284: 770-776.
- Ashery-Padan, R. und P. Gruss (2001). *Pax6 lights-up the way for eye development*. Curr Opin Cell Biol 13: 706-714.
- Bai, G., N. Sheng, Z. Xie, W. Bian, Y. Yokota, R. Benezra, R. Kageyama, F. Guillemot und N. Jing (2007). *Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1*. Dev Cell 13: 283-297.
- Baladron, V., M.J. Ruiz-Hidalgo, M.L. Nueda, M.J. Diaz-Guerra, J.J. Garcia-Ramirez, E. Bonvini, E. Gubina und J. Laborda (2005). *dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats*. Exp Cell Res 303: 343-359.
- Batlle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida und A. Garcia De Herreros (2000). *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol 2: 84-89.
- Betters, E., Y. Liu, A. Kjaeldgaard, E. Sundstrom und M.I. Garcia-Castro (2010). *Analysis of early human neural crest development*. Dev Biol 344: 578-592.
- Blank, V., P. Kourilsky und A. Israel (1992). *NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologues meet ankyrin-like repeats*. Trends Biochem Sci 17: 135-140.
- Boheler, K.R. (2009). *Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle*. J Cell Physiol 221: 10-17.
- Bolos, V., J. Grego-Bessa und J.L. de la Pompa (2007). *Notch signaling in development and cancer*. Endocr Rev 28: 339-363.
- Borggreffe, T. und F. Oswald (2009). *The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes*. Cell Mol Life Sci 66: 1631-1646.
- Bray, S.J. (2006). *Notch signalling: a simple pathway becomes complex*. Nat Rev Mol Cell Biol 7: 678-689.
- Briscoe, J. und B.G. Novitch (2008). *Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363: 57-70.
- Burns, C.E., D. Traver, E. Mayhall, J.L. Shepard und L.I. Zon (2005). *Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway*. Genes Dev 19: 2331-2342.
- Bylund, M., E. Andersson, B.G. Novitch und J. Muhr (2003). *Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity*. Nat Neurosci 6: 1162-1168.
- Cai, Z., M. de Bruijn, X. Ma, B. Dortland, T. Luteijn, R.J. Downing und E. Dzierzak (2000). *Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo*. Immunity 13: 423-431.
- Cano, A., M.A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M.J. Blanco, M.G. del Barrio, F. Portillo und M.A. Nieto (2000). *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol 2: 76-83.
- Cau, E. und P. Blader (2009). *Notch activity in the nervous system: to switch or not switch?* Neural Dev 4: 36.

- Chastagner, P., A. Israel und C. Brou (2008). *AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand*. PLoS One 3: e2735.
- Chen, M.J., T. Yokomizo, B.M. Zeigler, E. Dzierzak und N.A. Speck (2009). *Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter*. Nature 457: 887-891.
- Cheng, L.C., E. Pastrana, M. Tavazoie und F. Doetsch (2009). *miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche*. Nat Neurosci 12: 399-408.
- Cheung, M. und J. Briscoe (2003). *Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9*. Development 130: 5681-5693.
- Cheung, M., M.C. Chaboissier, A. Mynett, E. Hirst, A. Schedl und J. Briscoe (2005). *The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination*. Dev Cell 8: 179-192.
- Christ, B. und C.P. Ordahl (1995). *Early stages of chick somite development*. Anat Embryol (Berl) 191: 381-396.
- Christian, J.L. und R.T. Moon (1993). *Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of Xenopus*. Genes Dev 7: 13-28.
- Cinquin, O. (2007). *Understanding the somitogenesis clock: what's missing?* Mech Dev 124: 501-517.
- Conlon, F.L., K.M. Lyons, N. Takaesu, K.S. Barth, A. Kispert, B. Herrmann und E.J. Robertson (1994). *A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse*. Development 120: 1919-1928.
- Conlon, R.A., A.G. Reaume und J. Rossant (1995). *Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites*. Development 121: 1533-1545.
- Corbo, J.C., S. Fujiwara, M. Levine und A. Di Gregorio (1998). *Suppressor of hairless activates brachyury expression in the Ciona embryo*. Dev Biol 203: 358-368.
- Cordle, J., C. Redfieldz, M. Stacey, P.A. van der Merwe, A.C. Willis, B.R. Champion, S. Hambleton und P.A. Handford (2008). *Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity*. J Biol Chem 283: 11785-11793.
- de la Pompa, J.L., A. Wakeham, K.M. Correia, E. Samper, S. Brown, R.J. Aguilera, T. Nakano, T. Honjo, T.W. Mak, J. Rossant und R.A. Conlon (1997). *Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis*. Development 124: 1139-1148.
- Del Barrio, M.G., R. Taveira-Marques, Y. Muroyama, D.I. Yuk, S. Li, M. Wines-Samuelson, J. Shen, H.K. Smith, M. Xiang, D. Rowitch und W.D. Richardson (2007). *A regulatory network involving Foxn4, Mash1 and delta-like 4/Notch1 generates V2a and V2b spinal interneurons from a common progenitor pool*. Development 134: 3427-3436.
- Deneen, B., R. Ho, A. Lukaszewicz, C.J. Hochstim, R.M. Gronostajski und D.J. Anderson (2006). *The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord*. Neuron 52: 953-968.
- Deng, J., R. Shoemaker, B. Xie, A. Gore, E.M. LeProust, J. Antosiewicz-Bourget, D. Egli, N. Maherali, I.H. Park, J. Yu, G.Q. Daley, K. Eggan, K. Hochedlinger, J. Thomson, W. Wang, Y. Gao und K. Zhang (2009). *Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming*. Nat Biotechnol 27: 353-360.
- Diez del Corral, R. und K.G. Storey (2004). *Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis*. Bioessays 26: 857-869.
- Doi, A., I.H. Park, B. Wen, P. Murakami, M.J. Aryee, R. Irizarry, B. Herb, C. Ladd-Acosta, J. Rho, S. Loewer, J. Miller, T. Schlaeger, G.Q. Daley und A.P. Feinberg (2009). *Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts*. Nat Genet 41: 1350-1353.
- Eilken, H.M., S. Nishikawa und T. Schroeder (2009). *Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium*. Nature 457: 896-900.
- Eminli, S., J. Utikal, K. Arnold, R. Jaenisch und K. Hochedlinger (2008). *Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression*. Stem Cells 26: 2467-2474.
- Endo, Y., N. Osumi und Y. Wakamatsu (2002). *Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development*. Development 129: 863-873.

- Esain, V., J.H. Postlethwait, P. Charnay und J. Ghislain (2010). *FGF-receptor signalling controls neural cell diversity in the zebrafish hindbrain by regulating olig2 and sox9*. Development 137: 33-42.
- Finzsch, M., C.C. Stolt, P. Lommes und M. Wegner (2008). *Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression*. Development 135: 637-646.
- Fortini, M.E. (2009). *Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation*. Dev Cell 16: 633-647.
- Fujikura, J., K. Hosoda, H. Iwakura, T. Tomita, M. Noguchi, H. Masuzaki, K. Tanigaki, D. Yabe, T. Honjo und K. Nakao (2006). *Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas*. Cell Metab 3: 59-65.
- Fujikura, J., E. Yamato, S. Yonemura, K. Hosoda, S. Masui, K. Nakao, J. Miyazaki Ji und H. Niwa (2002). *Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors*. Genes Dev 16: 784-789.
- Gage, F.H., G. Kempermann, T.D. Palmer, D.A. Peterson und J. Ray (1998). *Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus*. J Neurobiol 36: 249-266.
- Gaiano, N., J.S. Nye und G. Fishell (2000). *Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain*. Neuron 26: 395-404.
- Gammill, L.S. und M. Bronner-Fraser (2003). *Neural crest specification: migrating into genomics*. Nat Rev Neurosci 4: 795-805.
- Gehring, W.J. und K. Ikeo (1999). *Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution*. Trends Genet 15: 371-377.
- Gill, G. (2004). *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* Genes Dev 18: 2046-2059.
- Glavic, A., F. Silva, M.J. Aybar, F. Bastidas und R. Mayor (2004). *Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in Xenopus embryos*. Development 131: 347-359.
- Goldring, M.B., K. Tsuchimochi und K. Ijiri (2006). *The control of chondrogenesis*. J Cell Biochem 97: 33-44.
- Gotz, M., A. Stoykova und P. Gruss (1998). *Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex*. Neuron 21: 1031-1044.
- Grandbarbe, L., J. Bouissac, M. Rand, M. Hrabe de Angelis, S. Artavanis-Tsakonas und E. Mohier (2003). *Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process*. Development 130: 1391-1402.
- Greene, N.D. und A.J. Copp (2009). *Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube*. Prenat Diagn 29: 303-311.
- Grindley, J.C., D.R. Davidson und R.E. Hill (1995). *The role of Pax-6 in eye and nasal development*. Development 121: 1433-1442.
- Haldin, C.E. und C. LaBonne (2010). *SoxE factors as multifunctional neural crest regulatory factors*. Int J Biochem Cell Biol 42: 441-444.
- Hall, B.K. (2000). *The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic*. Evol Dev 2: 3-5.
- Hanna, J., M. Wernig, S. Markoulaki, C.W. Sun, A. Meissner, J.P. Cassady, C. Beard, T. Brambrink, L.C. Wu, T.M. Townes und R. Jaenisch (2007). *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. Science 318: 1920-1923.
- Hanna, L.A., R.K. Foreman, I.A. Tarasenko, D.S. Kessler und P.A. Labosky (2002). *Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo*. Genes Dev 16: 2650-2661.
- Hatta, K. und M. Takeichi (1986). *Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development*. Nature 320: 447-449.
- Haubst, N., J. Berger, V. Radjendirane, J. Graw, J. Favor, G.F. Saunders, A. Stoykova und M. Gotz (2004). *Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development*. Development 131: 6131-6140.
- Henning, K., T. Schroeder, R. Schwanbeck, N. Rieber, E.H. Bresnick und U. Just (2007). *mNotch1 signaling and erythropoietin cooperate in erythroid differentiation of multipotent progenitor cells and upregulate beta-globin*. Exp Hematol 35: 1321-1332.

- High, F.A., M. Zhang, A. Proweller, L. Tu, M.S. Parmacek, W.S. Pear und J.A. Epstein (2007). *An essential role for Notch in neural crest during cardiovascular development and smooth muscle differentiation*. J Clin Invest 117: 353-363.
- Hirai, H., I.M. Samokhvalov, T. Fujimoto, S. Nishikawa und J. Imanishi (2005). *Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells*. Blood 106: 1948-1955.
- Hogan, B.L., G. Horsburgh, J. Cohen, C.M. Hetherington, G. Fisher und M.F. Lyon (1986). *Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse*. J Embryol Exp Morphol 97: 95-110.
- Hong, C.S. und J.P. Saint-Jeannet (2005). *Sox proteins and neural crest development*. Semin Cell Dev Biol 16: 694-703.
- Hooper, M., K. Hardy, A. Handyside, S. Hunter und M. Monk (1987). *HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells*. Nature 326: 292-295.
- Hori, K., M. Fostier, M. Ito, T.J. Fuwa, M.J. Go, H. Okano, M. Baron und K. Matsuno (2004). *Drosophila deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling*. Development 131: 5527-5537.
- Hu, B.Y., J.P. Weick, J. Yu, L.X. Ma, X.Q. Zhang, J.A. Thomson und S.C. Zhang (2010). *Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency*. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 4335-4340.
- Huang, W., X. Zhou, V. Lefebvre und B. de Crombrughe (2000). *Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer*. Mol Cell Biol 20: 4149-4158.
- Iemura, S., T.S. Yamamoto, C. Takagi, H. Uchiyama, T. Natsume, S. Shimasaki, H. Sugino und N. Ueno (1998). *Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early Xenopus embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 9337-9342.
- Ihrle, R.A. und A. Alvarez-Buylla (2008). *Cells in the astroglial lineage are neural stem cells*. Cell Tissue Res 331: 179-191.
- Inman, K.E. und K.M. Downs (2006). *Localization of Brachyury (T) in embryonic and extraembryonic tissues during mouse gastrulation*. Gene Expr Patterns 6: 783-793.
- Itoh, M., C.H. Kim, G. Palardy, T. Oda, Y.J. Jiang, D. Maust, S.Y. Yeo, K. Lorick, G.J. Wright, L. Ariza-McNaughton, A.M. Weissman, J. Lewis, S.C. Chandrasekharappa und A.B. Chitnis (2003). *Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta*. Dev Cell 4: 67-82.
- Jaffredo, T., R. Gautier, A. Eichmann und F. Dieterlen-Lievre (1998). *Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny*. Development 125: 4575-4583.
- Jehn, B.M., I. Dittert, S. Beyer, K. von der Mark und W. Bielke (2002). *c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1*. J Biol Chem 277: 8033-8040.
- Jen, Y., K. Manova und R. Benezra (1997). *Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis*. Dev Dyn 208: 92-106.
- Jung, S., R.H. Park, S. Kim, Y.J. Jeon, D.S. Ham, M.Y. Jung, S.S. Kim, Y.D. Lee, C.H. Park und H. Suh-Kim (2010). *Id proteins facilitate self-renewal and proliferation of neural stem cells*. Stem Cells Dev 19: 831-841.
- Kamachi, Y., M. Uchikawa, A. Tanouchi, R. Sekido und H. Kondoh (2001). *Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development*. Genes Dev 15: 1272-1286.
- Kanai-Azuma, M., Y. Kanai, J.M. Gad, Y. Tajima, C. Taya, M. Kurohmaru, Y. Sanai, H. Yonekawa, K. Yazaki, P.P. Tam und Y. Hayashi (2002). *Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice*. Development 129: 2367-2379.
- Kato, N. und H. Aoyama (1998). *Dermomyotomal origin of the ribs as revealed by extirpation and transplantation experiments in chick and quail embryos*. Development 125: 3437-3443.
- Keller, G., M. Kennedy, T. Papayannopoulou und M.V. Wiles (1993). *Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture*. Mol Cell Biol 13: 473-486.
- Kelsh, R.N. (2006). *Sorting out Sox10 functions in neural crest development*. Bioessays 28: 788-798.

- Kurooka, H., K. Kuroda und T. Honjo (1998). *Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region*. Nucleic Acids Res 26: 5448-5455.
- Lacaud, G., L. Gore, M. Kennedy, V. Kouskoff, P. Kingsley, C. Hogan, L. Carlsson, N. Speck, J. Palis und G. Keller (2002). *Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro*. Blood 100: 458-466.
- Lai, E.C. (2004). *Notch signaling: control of cell communication and cell fate*. Development 131: 965-973.
- Lancrin, C., P. Sroczynska, C. Stephenson, T. Allen, V. Kouskoff und G. Lacaud (2009). *The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage*. Nature 457: 892-895.
- Le Borgne, R., A. Bardin und F. Schweisguth (2005). *The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling*. Development 132: 1751-1762.
- Le Gall, M. und E. Giniger (2004). *Identification of two binding regions for the suppressor of hairless protein within the intracellular domain of Drosophila notch*. J Biol Chem 279: 29418-29426.
- Lee, J.E., S.M. Hollenberg, L. Snider, D.L. Turner, N. Lipnick und H. Weintraub (1995). *Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein*. Science 268: 836-844.
- Lee, S.K., B. Lee, E.C. Ruiz und S.L. Pfaff (2005). *Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells*. Genes Dev 19: 282-294.
- Lefebvre, V., R.R. Behringer und B. de Crombrughe (2001). *L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway*. Osteoarthritis Cartilage 9 Suppl A: S69-75.
- Lefebvre, V., P. Li und B. de Crombrughe (1998). *A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene*. EMBO J 17: 5718-5733.
- Lendahl, U., L.B. Zimmerman und R.D. McKay (1990). *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell 60: 585-595.
- Lewis, J. (1998). *Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates*. Semin Cell Dev Biol 9: 583-589.
- Li, Z., M.J. Chen, T. Stacy und N.A. Speck (2006). *Runx1 function in hematopoiesis is required in cells that express Tek*. Blood 107: 106-110.
- Light, W., A.E. Vernon, A. Lasorella, A. Iavarone und C. LaBonne (2005). *Xenopus Id3 is required downstream of Myc for the formation of multipotent neural crest progenitor cells*. Development 132: 1831-1841.
- Liu, P., M. Wakamiya, M.J. Shea, U. Albrecht, R.R. Behringer und A. Bradley (1999). *Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation*. Nat Genet 22: 361-365.
- Liu, Y. und P.A. Labosky (2008). *Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by Foxd3*. Stem Cells 26: 2475-2484.
- Lois, C. und A. Alvarez-Buylla (1993). *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia*. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 2074-2077.
- Lois, C. und A. Alvarez-Buylla (1994). *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain*. Science 264: 1145-1148.
- Lothian, C. und U. Lendahl (1997). *An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells*. Eur J Neurosci 9: 452-462.
- Louvi, A. und S. Artavanis-Tsakonas (2006). *Notch signalling in vertebrate neural development*. Nat Rev Neurosci 7: 93-102.
- Lowell, S., A. Benchoua, B. Heavey und A.G. Smith (2006). *Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells*. PLoS Biol 4: e121.
- Lutolf, S., F. Radtke, M. Aguet, U. Suter und V. Taylor (2002). *Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum*. Development 129: 373-385.
- Ma, Q., C. Kintner und D.J. Anderson (1996). *Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene*. Cell 87: 43-52.
- Maherali, N., R. Sridharan, W. Xie, J. Utikal, S. Eminli, K. Arnold, M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchieu, R. Jaenisch, K. Plath und K. Hochedlinger (2007). *Directly reprogrammed fibroblasts*

- show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution.* Cell Stem Cell 1: 55-70.
- Malatesta, P., E. Hartfuss und M. Gotz (2000). *Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage.* Development 127: 5253-5263.
- Malki, S., S. Nef, C. Notarnicola, L. Thevenet, S. Gasca, C. Mejean, P. Berta, F. Poulat und B. Boizet-Bonhoure (2005). *Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation.* EMBO J 24: 1798-1809.
- Matsuda, T., T. Nakamura, K. Nakao, T. Arai, M. Katsuki, T. Heike und T. Yokota (1999). *STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells.* EMBO J 18: 4261-4269.
- McGill, M.A. und C.J. McGlade (2003). *Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain.* J Biol Chem 278: 23196-23203.
- Meier-Stiegen, F., R. Schwanbeck, K. Bernoth, S. Martini, T. Hieronymus, D. Ruau, M. Zenke und U. Just (2010). *Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors.* PLoS One 5: e11481.
- Menn, B., J.M. Garcia-Verdugo, C. Yaschine, O. Gonzalez-Perez, D. Rowitch und A. Alvarez-Buylla (2006). *Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain.* J Neurosci 26: 7907-7918.
- Mikkelsen, T.S., J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderet, B.E. Bernstein, R. Jaenisch, E.S. Lander und A. Meissner (2008). *Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis.* Nature 454: 49-55.
- Miura, K., Y. Okada, T. Aoi, A. Okada, K. Takahashi, K. Okita, M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, M. Ohnuki, D. Ogawa, E. Ikeda, H. Okano und S. Yamanaka (2009). *Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines.* Nat Biotechnol 27: 743-745.
- Mohr, O.L. (1919). *Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila.* Genetics 4: 275-282.
- Moriyama, M., M. Osawa, S.S. Mak, T. Ohtsuka, N. Yamamoto, H. Han, V. Delmas, R. Kageyama, F. Beermann, L. Larue und S. Nishikawa (2006). *Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells.* J Cell Biol 173: 333-339.
- Morrison, S.J., S.E. Perez, Z. Qiao, J.M. Verdi, C. Hicks, G. Weinmaster und D.J. Anderson (2000). *Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells.* Cell 101: 499-510.
- Mukherjee, A., A. Veraksa, A. Bauer, C. Rosse, J. Camonis und S. Artavanis-Tsakonas (2005). *Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin.* Nat Cell Biol 7: 1191-1201.
- Nakagawa, M., M. Ichikawa, K. Kumano, S. Goyama, M. Kawazu, T. Asai, S. Ogawa, M. Kurokawa und S. Chiba (2006). *AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis.* Blood 108: 3329-3334.
- Nakanishi, K., Y.S. Chan und K. Ito (2007). *Notch signaling is required for the chondrogenic specification of mouse mesencephalic neural crest cells.* Mech Dev 124: 190-203.
- Namihira, M., J. Kohyama, K. Semi, T. Sanosaka, B. Deneen, T. Taga und K. Nakashima (2009). *Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells.* Dev Cell 16: 245-255.
- Nikolopoulou, V., N. Plachta, N.D. Allen, L. Pinto, M. Gotz und Y.A. Barde (2007). *Neurotrophin receptor-mediated death of misspecified neurons generated from embryonic stem cells lacking Pax6.* Cell Stem Cell 1: 529-540.
- Nishikawa, S.I., S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi und H. Kodama (1998). *Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages.* Development 125: 1747-1757.
- Nishikawa, S.I., S. Nishikawa, H. Kawamoto, H. Yoshida, M. Kizumoto, H. Kataoka und Y. Katsura (1998). *In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos.* Immunity 8: 761-769.
- Niwa, H. (2007). *How is pluripotency determined and maintained?* Development 134: 635-646.
- Niwa, H., T. Burdon, I. Chambers und A. Smith (1998). *Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3.* Genes Dev 12: 2048-2060.

- Niwa, H., J. Miyazaki und A.G. Smith (2000). *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*. Nat Genet 24: 372-376.
- Niwa, H., Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi und J. Rossant (2005). *Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation*. Cell 123: 917-929.
- Okita, K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka und S. Yamanaka (2008). *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. Science 322: 949-953.
- Okuda, T., J. van Deursen, S.W. Hiebert, G. Grosveld und J.R. Downing (1996). *AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis*. Cell 84: 321-330.
- Olivera-Martinez, I., J. Thelu und D. Dhouailly (2004). *Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome*. Int J Dev Biol 48: 93-101.
- Osumi, N., H. Shinohara, K. Numayama-Tsuruta und M. Maekawa (2008). *Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator*. Stem Cells 26: 1663-1672.
- Pelton, T.A., S. Sharma, T.C. Schulz, J. Rathjen und P.D. Rathjen (2002). *Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of in vivo and in vitro pluripotent cell development*. J Cell Sci 115: 329-339.
- Perumalsamy, L.R., M. Nagala, P. Banerjee und A. Sarin (2009). *A hierarchical cascade activated by non-canonical Notch signaling and the mTOR-Rictor complex regulates neglect-induced death in mammalian cells*. Cell Death Differ 16: 879-889.
- Philips, G.T., C.N. Stair, H. Young Lee, E. Wroblewski, M.A. Berberoglu, N.L. Brown und G.S. Mastick (2005). *Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type*. Dev Biol 279: 308-321.
- Piccolo, S., Y. Sasai, B. Lu und E.M. De Robertis (1996). *Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4*. Cell 86: 589-598.
- Pick, M., Y. Stelzer, O. Bar-Nur, Y. Mayshar, A. Eden und N. Benvenisty (2009). *Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells*. Stem Cells 27: 2686-2690.
- Pintar, A., A. De Biasio, M. Popovic, N. Ivanova und S. Pongor (2007). *The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference?* Biol Direct 2: 19.
- Pla, P., R. Moore, O.G. Morali, S. Grille, S. Martinuzzi, V. Delmas und L. Larue (2001). *Cadherins in neural crest cell development and transformation*. J Cell Physiol 189: 121-132.
- Planque, N., L. Leconte, F.M. Coquelle, S. Benkhelifa, P. Martin, M.P. Felder-Schmittbuhl und S. Saule (2001). *Interaction of Maf transcription factors with Pax-6 results in synergistic activation of the glucagon promoter*. J Biol Chem 276: 35751-35760.
- Quinn, J.C., M. Molinek, B.S. Martynoga, P.A. Zaki, A. Faedo, A. Bulfone, R.F. Hevner, J.D. West und D.J. Price (2007). *Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism*. Dev Biol 302: 50-65.
- Rampal, R., J.F. Arboleda-Velasquez, A. Nita-Lazar, K.S. Kosik und R.S. Haltiwanger (2005). *Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function*. J Biol Chem 280: 32133-32140.
- Rathjen, J., J.A. Lake, M.D. Bettess, J.M. Washington, G. Chapman und P.D. Rathjen (1999). *Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors*. J Cell Sci 112 (Pt 5): 601-612.
- Rechsteiner, M. (1988). *Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions*. Adv Enzyme Regul 27: 135-151.
- Revinski, D.R., A.R. Paganelli, A.E. Carrasco und S.L. Lopez (2010). *Delta-Notch signaling is involved in the segregation of the three germ layers in Xenopus laevis*. Dev Biol 339: 477-492.
- Ritz-Laser, B., A. Estreicher, N. Klages, S. Saule und J. Philippe (1999). *Pax-6 and Cdx-2/3 interact to activate glucagon gene expression on the G1 control element*. J Biol Chem 274: 4124-4132.
- Rowitch, D.H. und A.R. Kriegstein (2010). *Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification*. Nature 468: 214-222.
- Sakurai, K. und N. Osumi (2008). *The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes*. J Neurosci 28: 4604-4612.

- Sandberg, M., M. Kallstrom und J. Muhr (2005). *Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis*. Nat Neurosci 8: 995-1001.
- Sansom, S.N., D.S. Griffiths, A. Faedo, D.J. Kleinjan, Y. Ruan, J. Smith, V. van Heyningen, J.L. Rubenstein und F.J. Livesey (2009). *The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis*. PLoS Genet 5: e1000511.
- Sasaki, K., H. Yagi, R.T. Bronson, K. Tominaga, T. Matsunashi, K. Deguchi, Y. Tani, T. Kishimoto und T. Komori (1996). *Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 12359-12363.
- Sauka-Spengler, T. und M. Bronner-Fraser (2008). *A gene regulatory network orchestrates neural crest formation*. Nat Rev Mol Cell Biol 9: 557-568.
- Schroeder, T. und U. Just (2000). *mNotch1 signaling reduces proliferation of myeloid progenitor cells by altering cell-cycle kinetics*. Exp Hematol 28: 1206-1213.
- Schroeder, T., F. Meier-Stiegen, R. Schwanbeck, H. Eilken, S. Nishikawa, R. Hasler, S. Schreiber, G.W. Bornkamm und U. Just (2006). *Activated Notch1 alters differentiation of embryonic stem cells into mesodermal cell lineages at multiple stages of development*. Mech Dev 123: 570-579.
- Seymour, P.A., K.K. Freude, M.N. Tran, E.E. Mayes, J. Jensen, R. Kist, G. Scherer und M. Sander (2007). *SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool*. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 1865-1870.
- Shalaby, F., J. Ho, W.L. Stanford, K.D. Fischer, A.C. Schuh, L. Schwartz, A. Bernstein und J. Rossant (1997). *A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis*. Cell 89: 981-990.
- Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman und A.C. Schuh (1995). *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature 376: 62-66.
- Shaye, D.D. und I. Greenwald (2005). *LIN-12/Notch trafficking and regulation of DSL ligand activity during vulval induction in Caenorhabditis elegans*. Development 132: 5081-5092.
- Shen, M.M. (2007). *Nodal signaling: developmental roles and regulation*. Development 134: 1023-1034.
- Shen, M.M. und P. Leder (1992). *Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 8240-8244.
- Shin, J., J. Poling, H.C. Park und B. Appel (2007). *Notch signaling regulates neural precursor allocation and binary neuronal fate decisions in zebrafish*. Development 134: 1911-1920.
- Smith, J.L. und G.C. Schoenwolf (1989). *Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation*. J Exp Zool 250: 49-62.
- Spence, J.R., A.W. Lange, S.C. Lin, K.H. Kaestner, A.M. Lowy, I. Kim, J.A. Whitsett und J.M. Wells (2009). *Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells*. Dev Cell 17: 62-74.
- Spokony, R.F., Y. Aoki, N. Saint-Germain, E. Magner-Fink und J.P. Saint-Jeannet (2002). *The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in Xenopus*. Development 129: 421-432.
- St-Onge, L., B. Sosa-Pineda, K. Chowdhury, A. Mansouri und P. Gruss (1997). *Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas*. Nature 387: 406-409.
- Stadtfeld, M. und K. Hochedlinger (2010). *Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications*. Genes Dev 24: 2239-2263.
- Stahl, M., K. Uemura, C. Ge, S. Shi, Y. Tashima und P. Stanley (2008). *Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling*. J Biol Chem 283: 13638-13651.
- Stalsberg, H. und R.L. DeHaan (1969). *The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo*. Dev Biol 19: 128-159.
- Stanley, P. (2007). *Regulation of Notch signaling by glycosylation*. Curr Opin Struct Biol 17: 530-535.
- Stern, C.D. (2006). *Neural induction: 10 years on since the 'default model'*. Curr Opin Cell Biol 18: 692-697.
- Steventon, B., C. Carmona-Fontaine und R. Mayor (2005). *Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival*. Semin Cell Dev Biol 16: 647-654.

- Stolt, C.C., P. Lommes, E. Sock, M.C. Chaboissier, A. Schedl und M. Wegner (2003). *The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord*. Genes Dev 17: 1677-1689.
- Stolt, C.C., S. Schmitt, P. Lommes, E. Sock und M. Wegner (2005). *Impact of transcription factor Sox8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord*. Dev Biol 281: 309-317.
- Stolt, C.C. und M. Wegner (2010). *SoxE function in vertebrate nervous system development*. Int J Biochem Cell Biol 42: 437-440.
- Surani, M.A., K. Hayashi und P. Hajkova (2007). *Genetic and epigenetic regulators of pluripotency*. Cell 128: 747-762.
- Suter, D.M. und K.H. Krause (2008). *Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potential for cell therapy*. J Pathol 215: 355-368.
- Suter, D.M., D. Tirefort, S. Julien und K.H. Krause (2009). *A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells*. Stem Cells 27: 49-58.
- Swiatek, P.J., C.E. Lindsell, F.F. del Amo, G. Weinmaster und T. Gridley (1994). *Notch1 is essential for postimplantation development in mice*. Genes Dev 8: 707-719.
- Swiers, G., M. de Bruijn und N.A. Speck (2010). *Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1*. Int J Dev Biol 54: 1151-1163.
- Takahashi, K., K. Okita, M. Nakagawa und S. Yamanaka (2007). *Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures*. Nat Protoc 2: 3081-3089.
- Takahashi, K. und S. Yamanaka (2006). *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell 126: 663-676.
- Takemoto, T., M. Uchikawa, Y. Kamachi und H. Kondoh (2006). *Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1*. Development 133: 297-306.
- Takizawa, T., K. Nakashima, M. Namihira, W. Ochiai, A. Uemura, M. Yanagisawa, N. Fujita, M. Nakao und T. Taga (2001). *DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain*. Dev Cell 1: 749-758.
- Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa und T. Honjo (1995). *Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H)*. Curr Biol 5: 1416-1423.
- Tanigaki, K., F. Nogaki, J. Takahashi, K. Tashiro, H. Kurooka und T. Honjo (2001). *Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate*. Neuron 29: 45-55.
- Taylor, K.M. und C. Labonne (2005). *SoxE factors function equivalently during neural crest and inner ear development and their activity is regulated by SUMOylation*. Dev Cell 9: 593-603.
- Taylor, M.K., K. Yeager und S.J. Morrison (2007). *Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems*. Development 134: 2435-2447.
- Teng, L., N.A. Mundell, A.Y. Frist, Q. Wang und P.A. Labosky (2008). *Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors*. Development 135: 1615-1624.
- Tribulo, C., M.J. Aybar, S.S. Sanchez und R. Mayor (2004). *A balance between the anti-apoptotic activity of Slug and the apoptotic activity of msx1 is required for the proper development of the neural crest*. Dev Biol 275: 325-342.
- Tsarovina, K., J. Schellenberger, C. Schneider und H. Rohrer (2008). *Progenitor cell maintenance and neurogenesis in sympathetic ganglia involves Notch signaling*. Mol Cell Neurosci 37: 20-31.
- Ulloa, F. und E. Marti (2010). *Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube*. Dev Dyn 239: 69-76.
- Utikal, J., N. Maherali, W. Kulalert und K. Hochedlinger (2009). *Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells*. J Cell Sci 122: 3502-3510.
- Vega, S., A.V. Morales, O.H. Ocana, F. Valdes, I. Fabregat und M.A. Nieto (2004). *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes Dev 18: 1131-1143.
- Waddell, W.J. (1965). *A Simple, Rapid Method for Paper Chromatography of Barbiturates*. Clin Chem 11: 37-39.

- Wakamatsu, Y., T.M. Maynard und J.A. Weston (2000). *Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis*. Development 127: 2811-2821.
- Wang, Q., T. Stacy, M. Binder, M. Marin-Padilla, A.H. Sharpe und N.A. Speck (1996). *Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 3444-3449.
- Wang, Q., T. Stacy, J.D. Miller, A.F. Lewis, T.L. Gu, X. Huang, J.H. Bushweller, J.C. Bories, F.W. Alt, G. Ryan, P.P. Liu, A. Wynshaw-Boris, M. Binder, M. Marin-Padilla, A.H. Sharpe und N.A. Speck (1996). *The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo*. Cell 87: 697-708.
- Wernig, M., A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B.E. Bernstein und R. Jaenisch (2007). *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature 448: 318-324.
- Whitaker, J.R. und P.E. Granum (1980). *An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm*. Anal Biochem 109: 156-159.
- Wilkinson, D.G., S. Bhatt und B.G. Herrmann (1990). *Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation*. Nature 343: 657-659.
- Wilson, K.D., S. Venkatasubrahmanyam, F. Jia, N. Sun, A.J. Butte und J.C. Wu (2009). *MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells*. Stem Cells Dev 18: 749-758.
- Wilson, P.A. und A. Hemmati-Brivanlou (1995). *Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4*. Nature 376: 331-333.
- Winnier, G., M. Blessing, P.A. Labosky und B.L. Hogan (1995). *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. Genes Dev 9: 2105-2116.
- Xu, J., J.A. Watts, S.D. Pope, P. Gadue, M. Kamps, K. Plath, K.S. Zaret und S.T. Smale (2009). *Transcriptional competence and the active marking of tissue-specific enhancers by defined transcription factors in embryonic and induced pluripotent stem cells*. Genes Dev 23: 2824-2838.
- Yan, Y.L., J. Willoughby, D. Liu, J.G. Crump, C. Wilson, C.T. Miller, A. Singer, C. Kimmel, M. Westerfield und J.H. Postlethwait (2005). *A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development*. Development 132: 1069-1083.
- Yang, X., R. Klein, X. Tian, H.T. Cheng, R. Kopan und J. Shen (2004). *Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway*. Dev Biol 269: 81-94.
- Yang, X., T. Tomita, M. Wines-Samuelson, V. Beglopoulos, M.G. Tansey, R. Kopan und J. Shen (2006). *Notch1 signaling influences v2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord*. Dev Neurosci 28: 102-117.
- Ying, Q.L., M. Stavridis, D. Griffiths, M. Li und A. Smith (2003). *Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture*. Nat Biotechnol 21: 183-186.
- Yokomizo, T., M. Ogawa, M. Osato, T. Kanno, H. Yoshida, T. Fujimoto, S. Fraser, S. Nishikawa, H. Okada, M. Satake, T. Noda und Y. Ito (2001). *Requirement of Runx1/AML1/PEBP2alphaB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells*. Genes Cells 6: 13-23.
- Yonan, C.R., P.T. Duong und F.N. Chang (2005). *High-efficiency staining of proteins on different blot membranes*. Anal Biochem 338: 159-161.
- Yoon, K., S. Nery, M.L. Rutlin, F. Radtke, G. Fishell und N. Gaiano (2004). *Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors*. J Neurosci 24: 9497-9506.
- Yoshimoto, M. und M.C. Yoder (2009). *Developmental biology: Birth of the blood cell*. Nature 457: 801-803.
- Yu, J., M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II und J.A. Thomson (2007). *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science 318: 1917-1920.
- Zanotti, S. und E. Canalis (2010). *Notch and the skeleton*. Mol Cell Biol 30: 886-896.
- Zhou, G., V. Lefebvre, Z. Zhang, H. Eberspaecher und B. de Crombrughe (1998). *Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo*. J Biol Chem 273: 14989-14997.

- Zimmerman, L., B. Parr, U. Lendahl, M. Cunningham, R. McKay, B. Gavin, J. Mann, G. Vassileva und A. McMahon (1994). *Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors*. Neuron 12: 11-24.
- Zimmerman, L.B., J.M. De Jesus-Escobar und R.M. Harland (1996). *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4*. Cell 86: 599-606.
- Zorn, A.M. und J.M. Wells (2009). *Vertebrate endoderm development and organ formation*. Annu Rev Cell Dev Biol 25: 221-251.
- Zovein, A.C., J.J. Hofmann, M. Lynch, W.J. French, K.A. Turlo, Y. Yang, M.S. Becker, L. Zanetta, E. Dejana, J.C. Gasson, M.D. Tallquist und M.L. Iruela-Arispe (2008). *Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell 3: 625-636.

7. Publikationen

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden in dem folgenden Artikel veröffentlicht:

Meier-Stiegen F., R. Schwanbeck, K. Bernoth, S. Martini, T. Hieronymus, D. Ruau, M. Zenke und U. Just. (2010). *Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors*. PLoS One. 5:e11481.

Schwanbeck R., S. Martini, K. Bernoth und U. Just. (2011). *The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency*. Eur J Cell Biol. 90:572-81.

8. Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
bHLH	basic helix loop helix
βME	β-Mercaptoethanol
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CBF	core binding factor
CHX	Cycloheximid
d	Tag
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSL	Delta, Serrate und LAG-2
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ERT2	Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors (OHT-sensitive Mutante)
ESC	embryonic stem cell (Embryonale Stammzelle)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
Fgf	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Flk-1	Fetal liver kinase 1
Foxd3	Forkhead box D3
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Hes	Hairy and Enhancer of Split
Hey	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif
HMG	High mobility group
Hsp	Heat shock protein
Id	Inhibitor of DNA-binding/differentiation
IL	Interleukin
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IZM	Innere Zellmasse
LIF	Leukemia inhibitory factor
LNR	LIN12/Notch-repeats

MAML	Mastermind like
miRNA	microRNA
mRNA	messengerRNA
NERT	Fusionsprotein des intrazellulären Teils von murinem Notch1 und der Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors
NFIA	Nuclear factor I A
NICD	Notch intrazelluläre Domäne
NLS	Nuclear localization signal (Kernlokalisationssequenz)
OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
Pax	paired box gene
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEST	Prolin-Glutamin-Serin-Threonin-reich
RBP-Jk	Recombination recognition sequence binding protein at the Jk site
RING	Really interesting new gene
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Runx	Runt related transcription factor
SHH	Sonic Hedgehog
siRNA	small interfering RNA
Sox	SRY-box containing gene
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TACE	Tumor necrosis factor- α -converting enzyme
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming growth factor β
Wnt	wingless-related MMTV integration site

9. Lebenslauf

Name	Simone Martini
Geburtsdatum und -ort	1. Oktober 1981 in Schleswig
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

Universitäre Ausbildung

10/2008 – 12/2008	Forschungsaufenthalt am zell- und molekularbiologischen Institut des Karolinska Instituts in Stockholm/Schweden
Seit 11/2007	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Just
10/2007	Praktikum am molekularbiologischen Institut der Universität Aarhus/Dänemark
06/2007	Abschluss des Studiums mit dem Titel Diplom-Biologin
09/2006 – 06/2007	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genomforschung, Universität Bielefeld mit dem Titel: „Identifizierung von Einzelnukleotid-Mutationen mittels Kapillarelektrophorese-DNA-Fragmentanalytik in einer EMS-mutagenisierten Arabidopsis thaliana-Population“
2001 – 2007	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld

Schulbildung

2001	Abitur
1992-2001	Einsteingymnasium Rheda-Wiedenbrück
1988-1992	Wenneberggrundschule Rheda-Wiedenbrück

10. Danksagung

Frau Prof. Dr. Ursula Just möchte ich ganz besonders sowohl für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas als auch für die Betreuung dieser Arbeit und hilfreiche fachliche Ratschläge und Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. T. Roeder danke ich für die Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Urban Lendahl und Heather Main vom Institut für Zell- und Molekularbiologie des Karolinska Instituts in Stockholm für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor und die Unterstützung beim Erlernen der neuronalen Monolayer-Differenzierung.

Dr. Ralf Schwanbeck danke ich für die Hilfe beim Umgang mit Statistikberechnungen, Real-Time PCR und anderen molekularbiologischen Techniken und für das Korrigieren dieser Doktorarbeit.

Besonders möchte ich mich auch bei Melanie Boss und Silke Horn für die äußerst hilfreiche Unterstützung bei Zellkulturexperimenten und vor allem bei der Durchführung von zahlreichen RNA-Isolierungen, cDNA-Synthesen und Real-Time PCR-Versuchen bedanken.

Allen Mitarbeitern der AG Just gilt mein Dank für die sehr gute Zusammenarbeit und die entspannte Arbeitsatmosphäre während der Zeit meiner Doktorarbeit.

PD Dr. Claudia Lange und Dr. Bärbel Brunswig-Spickenheier vom Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf danke ich für die wertvollen Tipps zum FACSen und für das Bereitstellen von Isotypen und intrazellulären FACS-Kits zum Austesten.

Bei Dr. Robert Häsler, Dorina Oelsner und Tanja Wesse vom Institut für Klinische Molekularbiologie bedanke ich mich für die Möglichkeit der Nutzung des Real-Time PCR Gerätes.

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Simone Martini, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Fakultät zur Begutachtung vorgelegt.

Ich erkläre hiermit, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Kiel, den 14. Juni 2011

Simone Martini